

**Über ein präparatives
Elektrophorese-Verfahren
in Kartonpapier**

(Untersuchungen zur Methodik und Anwendung)

Friedrich Sperl

1961

**Über ein präparatives
Elektrophorese-Verfahren
in Kartonpapier**

(Untersuchungen zur Methodik und Anwendung)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Friedrich Sperl
aus Oberaltertheim

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:

Professor Dr. H. SCHWIEGK

Dekan:

Professor Dr. Dr. H. EYER

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 4. 1961



INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	5
Bisherige Verfahren	6
Eigenes Verfahren	13
Trennkammer	13
Kartonpapiere	16
Auftragung	19
Puffer	20
Stromversorgung und verwendete Spannung	22
Trennzeiten	23
Lagebestimmung der Zonen	23
Gewinnung der Reinfractionen aus dem Papier	24
Eiweissgehalt, Dialyse	27
Einengung	28
Leistungsfähigkeit der beschriebenen Methode	30
a) Charakterisierung der isolierten Fraktionen	30
b) Chemische Untersuchungen an den gewonnenen Eiweissfraktionen	36
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	43
Lebenslauf	47



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E I N L E I T U N G

Nach der Erkenntnis der Tatsache, dass das Eiweiss im Blutserum aus mehreren Fraktionen besteht, die sich in einem geeigneten Elektrolytsystem - im wesentlichen auf Grund ihrer verschiedenen Ladung und somit ihres unterschiedlichen isoelektrischen Punktes sowie ihrer spezifischen Molekülgrösse - voneinander trennen lassen, ergab sich einerseits zwangsläufig die Frage nach ihrer prozentualen Verteilung und deren Konstanz; ferner aber, inwieweit sich die Kenntnis dieser Verteilung als diagnostisches Hilfsmittel verwerten lässt und welche charakteristischen Verschiebungen im Gehalt der einzelnen Fraktionen bei bestimmten Krankheiten stattfinden.

Aus dieser Zielsetzung wurde die Elektrophorese für analytische Zwecke entwickelt; sie ist heute bereits zu einem nahezu unentbehrlichen Hilfsmittel für die Differentialdiagnostik geworden. Methoden zur quantitativen Auswertung sind von Turba und Enenkel sowie von Tiselius und Cremer angegeben worden; durch die Entwicklung des Transparenz- und Direktphotometrieverfahrens von Grassmann, Hannig und Knedel ist sie zu einem routinemässig gebräuchlichen Verfahren ausgebaut worden.

Andererseits aber - und diese Fragestellung dürfte zunächst in erster Linie von seiten der Forschung aufgeworfen sein - wollte man die einzelnen Fraktionen getrennt voneinander hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und deren Variabilität bei verschiedenen Erkrankungen näher untersuchen. Auf Grund dessen wurde im Laufe der Zeit eine ganze Reihe von Verfahren zur Gewinnung von Serumeiweiss-Fractionen durch präparative Elektrophorese entwickelt. Das theoretische Prinzip ist wohl bei allen dasselbe; sie unterscheiden sich jedoch z. T. wesentlich voneinander in der apparativen Ausführung, der Trägersubstanz und dem Puffer.

Die bisher bekannten Verfahren weisen z. T. recht erhebliche Mängel in Bezug auf den Reinheitsgrad der gewonnenen Fraktionen und die Ausbeute auf. Im Rahmen der Arbeiten von M. Knedel wurde nun ein neues Verfahren der präparativen Elektrophorese mit Kartonpapier als Trägermaterial entwickelt. In ersten Arbeiten von Knedel und Althaus wurde dieses Verfahren bereits mit Erfolg angewandt. Die Aufgabe dieser Arbeit war es, es methodisch nochmals durchzuarbeiten und es durch systematische Untersuchung der Versuchsvoraussetzungen und Bedingungen zuverlässig anwendbar und optimal leistungsfähig zu machen.

BISHERIGE VERFAHREN

Die ältesten Anordnungen zur präparativen Elektrophorese beruhen auf dem Prinzip der Mehrkammersysteme; sie schliessen sich eng an die Apparaturen zur Elektrodialyse von G. v. Schwerin und Mitarbeiter, W. Pauli u. a. an. Sie bestehen aus einem Behälter, der mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist und durch permeable Membranen in drei oder mehr Kammern unterteilt wird. In die mittlere Kammer wird die zu trennende Substanz gebracht, in die beiden äussersten die Elektroden. Je nach Ladung wandern die Ionen nach Anlegen einer geeigneten Spannung in der einen oder anderen Richtung. Man stellte jedoch alsbald fest, dass die in die Elektrodenräume eingewanderten Ionen hier durch anodische Oxydation beziehungsweise kathodische Reduktion teilweise zersetzt wurden und den weiteren Trennungsverlauf behinderten, indem die Zersetzungsprodukte nicht nur die Fraktionen verunreinigten, aus denen sie hervorgegangen waren, sondern auch auf Grund nunmehr z. T. anderer Ladung wieder in die mittleren Kammern zurückwanderten und somit weitere Fraktionen in Mitleidenschaft zogen. Diesem Nachteil begegnete man in der Weise, dass man die Elektrodenkammern durch semipermeable Membranen, die also wohl die Elektrolytionen, nicht aber die grossen Eiweissmoleküle hindurchtreten liessen, von den übrigen Kammern trennte.

Im Laufe der Entwicklung wurden die permeablen Membranen zwischen den einzelnen Kammern durch Glasdiaphragmen oder Flüssigkeitsstromschlüssel (Heber u. a.) ersetzt; es zeigte sich nämlich, dass die verwendeten Membranen für Eiweiskörper keine befriedigende Durchgängigkeit aufwiesen, ferner an den Membranen störende Potentialsprünge sowie Behinderung des Trennvorgangs durch Elektroosmose auftraten.

Bald erkannte man auch die Zweckmässigkeit der Konstanthaltung des pH -Wertes, und so wurden als Elektrolyte Pufferlösungen eingeführt.

Aus dem Bestreben, vollkommener Trennungen zu erzielen, ferner die Wanderungsverhältnisse im einzelnen kennenzulernen und auch während des Versuches mittels optischer Methoden beobachten zu können, suchte man nach einem Verfahren, das auf die Unterteilung in mehrere Kammern verzichtet, und entwickelte schliesslich die Methode der wandernden Grenzflächen in Gestalt des U-Rohr-Apparates.

Die U-Rohr-Anordnung in ihrer ursprünglichen Form wurde bereits von dem Physiker Walter Nernst im Jahre 1897 zur Trennung von Metallionen beschrieben. Später wurde diese Methode in erster Linie von A. Tiselius und H. Theorell wieder aufgegriffen und für die Trennung von hochmolekularen organischen Verbindungen - vor allem von Serumproteinen - weiter ausgebaut und in ihren technischen Einzelheiten verfeinert.

Man geht hierbei folgendermassen vor: In einem U-Rohr aus Glas wird der untere Teil mit dem zu trennenden Lösungsgemisch gefüllt; sodann wird dieses Gemisch in beiden Schenkeln des U-Rohres mit einer Pufferlösung überschichtet. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass keine Vermischung der beiden anein-

ander grenzenden Medien durch Turbulenz eintritt. Voraussetzung hierfür ist auch, dass der verwendete Puffer eine geringere Dichte besitzt als die zu trennende Substanz, da er sonst wegen des labilen Zustandes sofort nach unten absinken und sich hierbei z. T. mit der zu untersuchenden Lösung vermischen würde.

Die beiden Enden des U-Rohres werden nunmehr mittels puffergefüllter Röhren- oder Schlauchsysteme mit den Elektrodengefässen leitend verbunden. Die Elektroden werden auch hier sowie bei allen weiteren Anordnungen zur Verhinderung der Bildung von Spaltprodukten durch Elektrolyse (s.o.) in eigenen Gefässen untergebracht.

Bis zum Stromschluss liegen die zu trennenden Fraktionen gleichmässig verteilt in der mit Puffer überschichteten Lösung vor. Sobald nun der Stromkreis geschlossen ist und ein Potentialgefälle im U-Rohr vorliegt, fangen die verschiedenen Fraktionen zu wandern an. Jede der Fraktionen besitzt bei gegebenen Bedingungen (Art des Trägermaterials, hier also des Puffers, sowie vorgegebene Feldstärke, Temperatur u.a.) ihre spezifische Wanderungsgeschwindigkeit. Die elektromotorische Kraft ist entlang dem gesamten U-Rohr die gleiche, es liegt also ein lineares Potentialgefälle vor. Die Angriffsflächen der einzelnen zu trennenden Substanzen für die elektromotorische Kraft - also ihre Ladungen - sind jedoch verschieden gross. Andererseits wird die Wanderung durch Reibung im Trägermedium gehemmt; diese hängt ab von der Grösse und Gestalt der wandernden Teilchen. Der Reibungswiderstand als hemmende Kraft ist somit ebenfalls für jedes Teilchen spezifisch. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist folglich direkt proportional der Ladung und umgekehrt proportional dem Reibungswiderstand.

Man denke sich nun zum besseren Verständnis der Wanderungsvorgänge das U-Rohr zu einem geraden, horizontal liegenden Rohr aufgebogen. Das zu trennende Substanzgemisch befindet sich jetzt in der Mitte; es grenzt zu beiden Seiten in senkrecht zur Rohr-Achse gelegenen Ebenen an den hier befindlichen Puffer. In dem Gemisch mögen sich n zu trennende Fraktionen $F_1, F_2, \dots, F_n$ mit ihrer jeweils dazugehörigen Wanderungsgeschwindigkeit $v_1, v_2, \dots, v_n$ befinden, wobei die Reihenfolge in der Numerierung der Fraktionen nach der Grösse ihrer Wanderungsgeschwindigkeit angeordnet sein soll, also $v_1 < v_2 < \dots < v_{n-1} < v_n$, wobei die ersten Glieder auch negative Werte annehmen können; das würde lediglich bedeuten, dass ein Teil der Fraktionen in umgekehrter Richtung wandert und somit entgegengesetzte Ladung besitzt.

Die allgemeine Definition der Geschwindigkeit - formelmässig ausgedrückt - lautet bekanntlich

$$v = \frac{ds}{dt},$$

wobei s den Weg, t die Zeit bedeuten. Da die einzelnen Fraktionen - abgesehen von einer nur kurze Zeit dauernden Anfangsbeschleunigung, die praktisch nicht ins Gewicht fällt - mit konstanter Geschwindigkeit wandern, kann man hier den Differentialquotient vernachlässigen und einfach setzen:

$$v = \frac{s}{t}.$$

Für den Abstand der Trennebenen zwischen Puffer-Gemisch-Puffer, d.h. der Vorder- und Rückfront des Gemisches, möge noch die Bezeichnung s_G eingeführt werden. Hat nun die Fraktion F_2 den Weg $s_2 = s_G$, F_1 den Weg s_1 zurückgelegt, wobei $s_1 < s_2$, da nach Definition $v_1 < v_2$ gilt, so ist F_2 völlig aus dem Raum gewandert, den es ursprünglich gemeinsam mit den anderen Fraktionen innehatte. Gleichzeitig ist aber F_1 nachgerückt, so dass sich F_1 und F_2 noch zum Teil überlagern. Je grösser nun die Geschwindigkeitsdifferenz der beiden Fraktionen ist, desto schneller ist ihre völlige Trennung erreicht. Oder anders ausgedrückt: Die Zeitdauer bis zur völligen Auftrennung hängt nicht von der absoluten Geschwindigkeit der einzelnen Fraktionen, sondern von ihrer relativen Geschwindigkeit zueinander ab. Ein Beispiel möge diesen Sachverhalt veranschaulichen: Eine Zugmaschine mit einer Geschwindigkeit von 15 km/h braucht zum Überholen eines Fuhrwerkes (5 km/h) die selbe Zeit wie ein Omnibus (70 km/h), der einen Lastwagen (60 km/h) überholt, wobei sämtliche Fahrzeuge die gleiche Wagenlänge besitzen sollen; die hierbei zurückgelegten Wege dagegen unterscheiden sich natürlich um ein Vielfaches.

Wenn wir jetzt wieder auf unsere Anordnung zurückkommen, so ist hier die vollständige Trennung sämtlicher Fraktionen erreicht, sobald die beiden Fraktionen mit der geringsten Geschwindigkeitsdifferenz um den Weg s_G , also um ihre eigene Länge, gegeneinander verschoben sind. Ist $\Delta v_m = v_{m+1} - v_m$ (wobei $1 \leq m \leq n-1$) die kleinste Geschwindigkeitsdifferenz, so lässt sich die Zeit t_E bis zur vollständigen Trennung wie folgt berechnen:

$$\Delta v_m = \frac{s_G}{t_E}; \quad t_E = \frac{s_G}{\Delta v_m}.$$

In Wirklichkeit muss eine etwas längere Zeit angenommen werden: Die Zonen haben sich vom Zeitpunkt der Überschichtung mit Puffer bis zur Beendigung des Versuches auf Grund der Brown'schen Bewegung, also durch Diffusion, um einen gewissen Betrag verbreitet. Ferner benötigt man zur quantitativen Gewinnung einen Mindestabstand zwischen den Vorder- und Rückfronten der aufeinander folgenden Fraktionen.

Bei hoher Wanderungsgeschwindigkeit der Fraktionen müssten die Ausmasse des U-Rohres ziemlich gross gewählt werden, damit die schnellste Fraktion nicht aus dem U-Rohr, wo sich ja die Trennung vollziehen soll, über das Röhren- oder Schlauchsystem bis zu den Elektrodengefässen gelangt. Dieses Problem löst A. Tiselius in der Weise, dass er - sobald die erste Fraktion das Ende des Trennrohres erreicht hat - eine Gegenströmung im U-Rohr erzeugt, so dass die Wanderung dieser Fraktion eben kompensiert wird, d.h. die Fraktion relativ zum Gefäss sich in Ruhe befindet, während die übrigen Fraktionen langsam zurückgedrängt werden.

Bei sämtlichen Anordnungen mit homogenen Medien als Trägersubstanz muss

die Temperatur konstant gehalten werden. Man arbeitet hierbei im allgemeinen bei einer Temperatur von 4°C . Bei etwaigen Temperaturdifferenzen innerhalb des U-Rohres, die bei Stromfluss durch die entstehende Joule'sche Wärme hervorgerufen werden, würden hierdurch bedingte Thermostrome den Trennungsvorgang ungünstig beeinflussen und ferner die wärmeren Teilchen wegen ihrer nunmehr geringeren Dichte einen Auftrieb erfahren und somit eine Vermischung der Fraktionen herbeiführen.

Dieser Umstand erfordert einen recht hohen Aufwand und ist gerade bei Anordnungen für präparative Zwecke besonders erheblich, da für diese Apparaturen ziemlich grosse Ausmasse nötig sind, um überhaupt den Forderungen nach ausreichender Ausbeute gerecht zu werden.

In der Praxis hat sich nun gezeigt, dass die Trennung von Systemen aus mehr als zwei Fraktionen mit der U-Rohr-Anordnung recht unvollständig ist. Die beiden äusseren Fraktionen - also bei Blutserum Albumin und die γ -Fraktion - können zwar rein gewonnen werden, die mittleren Fraktionen bleiben jedoch als Gemisch im Bodenteil liegen. Bei der Anwendung dieser Methode für analytische Zwecke ist dieser Umstand ziemlich gleichgültig, da immerhin eine teilweise Auftrennung der Mittelfractionen erreicht wird und somit der Brechungsgradient - das ist die Differenz der Brechungsindices zweier unterschiedlicher Medien in Bezug auf die jeweilige Wegstrecke - zur quantitativen Bestimmung ermittelt werden kann. Für die präparative Gewinnung von Serumeiweiss-Fractionen befriedigte dieses System jedoch nicht und man sah sich gezwungen, anderweitig nach Möglichkeiten zu suchen.

Es wurde dabei ein völlig neuer Weg eingeschlagen: Man ersetzte die homogene Trägersubstanz, wie sie bisher in der U-Rohr-Apparatur ihre Anwendung fand, durch ein heterogenes Medium in Platten- oder Blockform. So beschrieben im Jahre 1946 R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin eine Anordnung mit Kieselgel als Trägermittel. Später suchten H. G. Kunkel und R. J. Slater in systematisch durchgeführten Experimenten nach einer Substanz mit optimalen Eigenschaften; sie erkannten schliesslich, dass Kartoffelstärke vor allen andern die besten Ergebnisse liefert. Es zeigte sich nämlich, dass Stärke kaum irgendwelche Adsorption sowie nur äusserst geringe elektroosmotische Strömungen aufweist.

In einer späteren Arbeit wurde von O. Smithies die Anwendung von Stärkegel anstelle von Stärkekörnern beschrieben. Die Serumapplikation erfolgt in der Weise, dass man einen schmalen Schlitz in den Gel-Block einschneidet und ein mit Serum getränktes Filterpapierstreifen einlegt oder das Serum einfach in eine schmale Rinne einlaufen lässt. Eine ähnliche Methode wurde ebenfalls erfolgreich angewandt, indem das Serum mit Glaspulver oder Stärke zu einem Brei angerührt und in die Rinne eingestrichen wird.

Zur Vermeidung von Verdunstung wird die Stärkeplatte mit Mineralöl oder ähnlichem Material überschichtet. Besondere Kühlvorrichtungen sind hier nicht nötig, solange die Spannung nicht zu hoch gewählt und die Anordnung bei freiem Luftzutritt auf eine gut wärmeleitende Platte (z. B. aus Kupfer) gestellt wird.

Nach erfolgter Trennung werden die Fraktionen ausgeschnitten und in geeigneter Weise eluiert. Zur Orientierung über die Lage der einzelnen Fraktionen wird vorher ein schmaler Teststreifen abgeschnitten und entsprechend gefärbt.

Nach der Beschreibung von O. Smithies zeichnet sich die Trennung durch eine bis dahin noch nicht beobachtete scharfe Abgrenzung der Fraktionen, z. T. sogar durch Aufteilung in verschiedene Unterfraktionen aus. Ein Nachteil bei dieser Methode dagegen besteht darin, dass die Trägerplatten jeweils direkt vor jeder Trennung neu zubereitet werden müssen und ihre Herstellung erheblichen Arbeitsaufwand und sorgfältige Ausführung erfordert.

Einige Vorteile dieser horizontalen Ausführung gegenüber bietet die mit Stärke oder Baumwollcellulose gefüllte vertikale Säulenordnung, wie sie bereit im Jahre 1939 von T. B. Coolidge, später - mit homogenisiertem Filtrierpapier als Träger - von W. Bockemüller und R. Rebling beschrieben wurde. Das Serum wird in die untere Öffnung des Trennrohres eingeführt und die Wanderung erfolgt bei entsprechender Polung von unten nach oben. Eine ähnliche Anordnung wurde von P. Flodin und J. Porath entwickelt; sie verwenden die U-Rohr-Anordnung, füllen jedoch den einen Schenkel, welcher herausnehmbar ist und mittels Glas-schliffen mit der übrigen Apparatur zusammengefügt werden kann, mit Kartoffelstärke. Diese wird mit dem Serum überschichtet; die Trennung geht hier also in absteigender Richtung vor sich. Die durch den Stromfluss erzeugte Wärme kann durch einen mit Wasser durchspülten Kühlmantel abgeleitet werden. Nach Beendigung des Versuches wird das Trennrohr herausgenommen und die Eiweiss-Fraktionen mit Puffer eluiert. Das Eluat wird von einem Fraktionskollektor aufgefangen und die einzelnen Fraktionen werden auf diese Weise nacheinander gewonnen. Der wesentliche Vorteil gegenüber der Plattenanordnung dürfte der sein, dass die einmal gepackte Säule nacheinander zu wiederholten Malen verwendet werden kann, während die Platten nach jedem Versuch zerschnitten und erst wieder neu hergestellt werden müssen.

Eine Methode, die nach völlig anderen Prinzipien arbeitet, wurde von W. Grassmann und K. Hannig 1949 und wenig später und unabhängig davon von H. Svensson und J. Brattsten beschrieben. Sie kombinierten die Elektrophorese mit der Arbeitsweise der vertikalen Papierchromatographie. Die ersten Anregungen stammen von G. Haugaard und T. D. Kroner, die im Jahre 1948 eine neue Methodik der Papierchromatographie beschrieben, bei der sie gleichzeitig senkrecht zur Strömungsrichtung ein elektrisches Feld anlegten. W. Grassmann und K. Hannig arbeiteten nun dieses Arbeitsverfahren gründlich aus, nur dass sie eben umgekehrt die Methoden der Papierchromatographie auf die präparative Elektrophorese anwandten. Sie wählten zunächst Seesand und Glasperlen in Küvetten als Trägermedium, wandten sich jedoch schliesslich dem Filtrierpapierkarton zu. Diese Methode fand in der V- beziehungsweise VA-Apparatur routinemässige Anwendung. Mit ihren Möglichkeiten und Grenzen hat sich bereits G. Althaus kritisch auseinandergesetzt.

In der Folgezeit haben W. Grassmann und K. Hannig ihre Methode noch

entscheidend verbessert. Mit ihrer jetzt gebräuchlichen VAP-Apparatur erreichen sie eine um ein Vielfaches erhöhte Ausbeute. Die hierbei benötigte Kühlung erfolgt durch einen auf -20° vorgekühlten Luftstrom, der die eine Seite des Filtrierpapierkartons gleichmässig überstreicht. Gleichzeitig wird die hierbei durch Verdunstung verlorene Flüssigkeitsmenge auf der anderen Seite des Kartons durch dosiertes Aufdampfen wieder ersetzt. Verschiedenartige Regelmechanismen sorgen dafür, dass die Präparation der Fraktionen über längere Zeit und mit scharfen Grenzen abläuft, ohne dass eben störende Effekte vorzeitig zu einem Abbruch des Versuchs zwingen.

Zu erwähnen sind hier noch die von anderen Autoren verwendeten Apparaturen, so von H. H. Strain und Mitarbeiter, E. L. Durum, J. Brattsten und A. Nilsson, G. Dicastro und M. San Marco, ferner H. Peeters, P. Vuylsteke und R. Noe; teilweise kamen sie nicht über einfache Versuche hinaus. J. Brattsten hatte schon bald mit H. Svensson für Grundversuche eine einfache Apparatur verwendet. In den darauffolgenden Jahren bemühte er sich besonders um die Entwicklung eines brauchbaren Gerätes für diese Zwecke. Nach gründlichen Untersuchungen erkannte er die Versuchsvoraussetzungen und baute eine Trennkammer, mit der schon recht gute präparative Trennungen durchgeführt werden konnten.

Die Papierelektrophorese haben zuerst P. König sowie D. V. Klobusitzky und P. König durchgeführt. Es gelang ihnen, auf diesem Wege Schlangentoxine zu trennen. Danach hat G. Beraz dieses Verfahren als Elektrochromatographie beschrieben. All diese Arbeiten sind wieder in Vergessenheit geraten. Erst Th. Wieland und E. Fischer sowie E. L. Durum haben - unabhängig voneinander - dieses Verfahren neu wiederentdeckt und beschrieben. Bald darauf wurde dieses Verfahren von F. Turba und H. J. Enenkel, ferner von H. D. Cremer und A. Tiselius zur Trennung von Plasmaproteinen verwendet. W. Grassmann und K. Hannig führten eingehende Untersuchungen der grundlegenden methodischen Voraussetzungen durch und entwickelten das heute zumeist nach ihrer Methodik angewandte Standardverfahren. Seitdem ist eine Unzahl von Veröffentlichungen über dieses Gebiet erschienen.

Schon R. Witmer hat versucht, auf diesem Wege präparativ Proteinfractionen zu gewinnen. Bei seinen Untersuchungen über Augentuberkulose trennte er Serum mit einem bekannt hohen Agglutinationstiter bei der Reaktion nach Middlebrock - Dubos. Er halbierte die Streifen der Länge nach und färbte die eine Hälfte zur Orientierung, während er aus der anderen Hälfte des Streifens die einzelnen Zonen eluierte. Mit dem dabei isolierten Eiweiss führte er die hochempfindliche serologische Hämagglutination durch und konnte dabei die Lokalisation der für diese Reaktion verantwortlichen Antikörper im Gamma-Globulin-Bereich nachweisen. In ähnlicher Weise arbeitete E. Nikkilä. Er nahm aber dazu breitere Streifen und es gelang ihm mit Hilfe der von B. Swahn beschriebenen Färbemethode, die Lipidkomponenten zu lokalisieren. Er gewann so durch Extraktion mit Alkohol-Äther-Gemischen die entsprechenden Fraktionen, um dann Cholesterin und Phospholipide chemisch nachzuweisen. Noch weiter gingen E. M. Russ, H. A. Eder und D. P. Barr.

Sie legten mehrere Streifen gewöhnliches Trennpapier aufeinander und trennten Serum auf diese Weise. Dadurch gelang es ihnen, für die nachfolgende Elution die Proteinmenge zu erhöhen. Ebenso verwendeten A. Fischer und M. Behrens diese Methode, die an das "Chromatopack-Verfahren" von W.L. Porter bei der Papierchromatographie erinnert. Diese Methode hat sich jedoch als unrentabel erwiesen; sie fordert einen grossen Arbeitsaufwand, zu dem die Ausbeute in keinem Verhältnis steht. Bessere Resultate erzielten F. Hartmann und H.J. Müller. Sie verbreiterten die Trennstreifen bis auf 15 cm und arbeiteten mit dickerem Papier (Nr. 2074 der Firma Schleicher und Schüll). Den selben Weg schlugen A.L. Latner und Mitarbeiter ein. Sie trennten bei einer Breite von 5 cm auf Whatman-Papier Nr. 31. F. Hartmann hatte erkannt, dass es unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist, Zonenimperfectionen zu vermeiden. Diese Erkenntnis war die Voraussetzung für den von ihm beschrittenen Weg, auf breiterem Papier nach dem normalen Verfahren zu trennen.

Seit 1952 arbeiten M. Knedel und Mitarbeiter daran, ein diskontinuierliches Verfahren der präparativen Papierelektrophorese zu entwickeln. Das Ziel dabei war, mit möglichst geringem apparativen Aufwand und einfacher Handhabung eine befriedigende tägliche Ausbeute zu erreichen. Das war notwendig geworden, denn es waren immer neue Fragen aufgetaucht, für deren Beantwortung die präparative Gewinnung von Eiweissfraktionen aus Serum und sonstigen biologischen Flüssigkeiten die Voraussetzung war für chemische, immunologische und experimentelle Untersuchungen.

M. Knedel und G. Althaus haben bereits zum ersten Mal 1955 über dieses Verfahren berichtet. Gleichzeitig und unabhängig davon haben H.E. Schultze und H. Biel ein präparatives Verfahren ausgearbeitet. Nach ihrem Verfahren wird die Auftrennung von 50 cm³ Serum in 10 Trennkammern mit je 10 Streifen ermöglicht. Die ganze Anlage befindet sich in einem Kühlraum von 6° C. Eine zusätzliche Kühlung erfolgt durch je ein flaches Küvettenpaar, zwischen denen die Trennstreifen frei angebracht sind. Hierdurch kann die Temperatur auf dem eingelegten Filtrierpapierkarton so niedrig gehalten werden, dass sie +26° C nicht überschreitet.

Inzwischen wurde von M. Knedel und Mitarbeiter das Verfahren weiter ausgearbeitet und so weit apparativ entwickelt, dass es jetzt als routinemässig anwendbares Verfahren der präparativen Elektrophorese beschrieben werden kann.

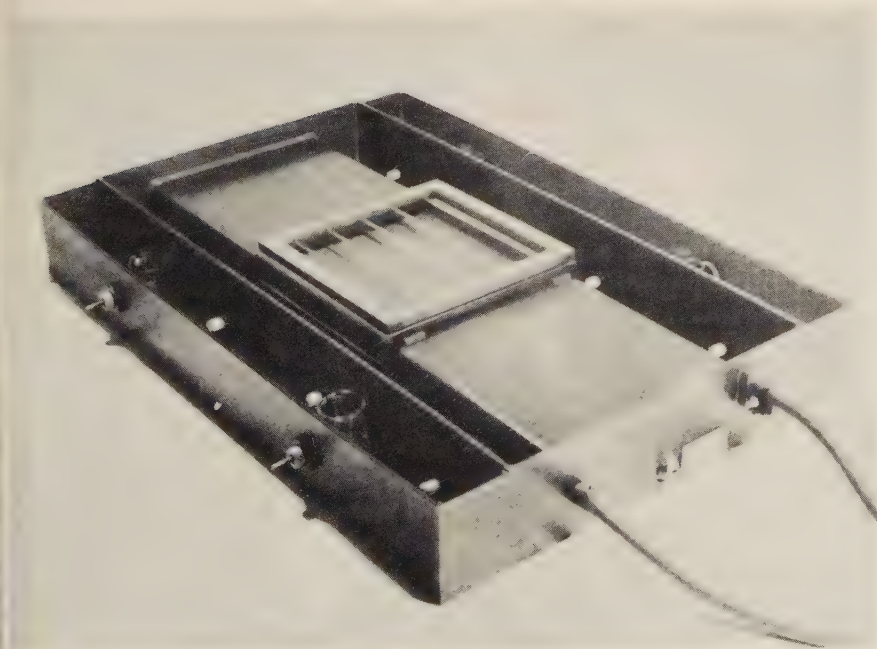
EIGENES VERFAHREN

Im folgenden sollen die Bedingungen beschrieben werden, die sich auf Grund unserer Arbeiten nunmehr als Voraussetzung für eine einwandfreie Anwendung des Verfahrens zur präparativen Elektrophorese ergeben haben.

Trennkammer.

In Abbildung 1 wird die von uns verwendete Trennkammer dargestellt. Es ist eine Kammer aus Kunststoff mit den Massen 66 x 45 cm. Ihre Bauweise ist im Prinzip die der Kammern, wie sie allgemein für das Verfahren der analytischen Papierelektrophorese üblich sind. Auch bei ihr ist der Pufferraum durch eine Trennwand unterteilt; In den einen Teil, in dem sich die Elektroden befinden, und den, in welchen die Enden der Trennstreifen eintauchen. Mit Glaswolle gefüllte Glasdiaphragmen sorgen für ungehinderten Durchtritt des elektrischen Stromes. Auf diese

ABBILDUNG 1

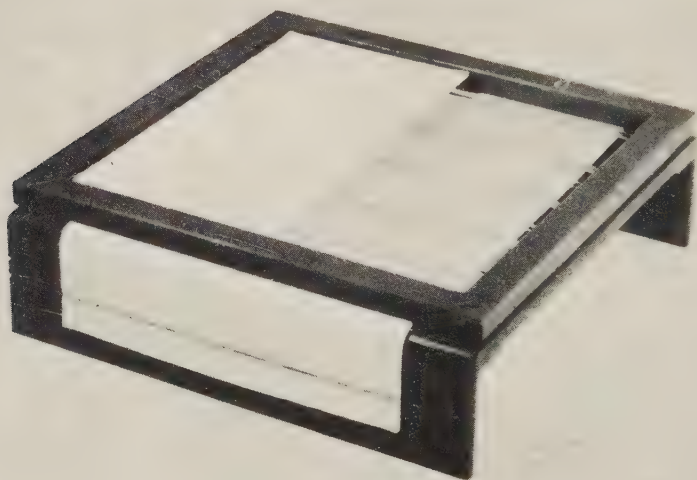


Trennkammer. Die Deckplatte aus Glas ist abgenommen. In der Trennkammer ist nur eine der drei Brücken mit ihrem Deckrahmen eingesetzt.

Weise wird erreicht, dass Elektrolyseprodukte aus dem Teil, der die Elektroden enthält, von den Trennstreifen ferngehalten werden. Als Elektroden werden reichlich bemessene Platinfolien verwendet. Um dabei stärkere p_{H_2} -Verschiebungen zu verhüten, werden diese in den Pufferräumen der Kammer in einem mehrkammrigen Glaslabyrinth untergebracht. Zur Entgasung des Mittelteils der Elektroden sind weite Abzugsröhren angebracht. Ferner ist durch eine Verbindung, die mit einem Glashahn verschlossen wird, dafür gesorgt, dass in sämtlichen Pufferräumen der Kammer gleiches Niveau eingestellt werden kann.

Jede Kammer kann drei Brücken (Abbildung 2) aufnehmen. Ihre Grösse beträgt 22 x 21 cm. Auf diese können 30 cm lange Kartonstreifen bis zu einer Breite von 18 cm aufgelegt werden. Die ausnutzbare Trennstrecke ist 16 cm lang. Quer zur Richtung der Trennstreifen sind in der Brücke waagrecht dünne Glasstäbe angebracht. Dadurch wird verhindert, dass der mit Puffer gesättigte Trennstreifen

ABBILDUNG 2



Brücke. Auf die Brücke ist ein Kartontrennstreifen mit den Massen 15 x 30 cm aufgelegt und seitlich mit Ringgummis befestigt. Der Karton auf dem Deckrahmen zum Auffangen des abtropfenden Kondenswassers ist hier halbiert, damit die Trägerstäbe aus Glas darunter sichtbar sind.

nach unten durchhängt. Die Qualität der Trennung wird durch dieses Aufliegen auf die Glasstäbe in keiner Weise beeinträchtigt. Auf diese mit dem Trennstreifen beschickte Brücke wird ein Deckrahmen gelegt, dessen sichere Lage durch vier Zapfen an den Ecken gewährleistet ist. Dieser Deckrahmen hat ebenfalls quer verlaufende Glasstäbe, auf die ein Karton von 18 x 18 cm zu liegen kommt. Die Aufgabe dieses Kartons ist, das von der Deckplatte abtropfende Kondenswasser aufzufangen und so etwaige Störungen in den Trennstreifen zu verhindern. Des weiteren ist der nunmehr feuchte Deckkarton entscheidend mit an der völligen Raumsättigung mit Wasserdampf beteiligt; die Trennkammer ist nämlich durch die Deckplatte nach aussen hin dicht abgeschlossen; dies aber ist Voraussetzung für das Zustandekommen der Feuchtigkeitssättigung. Durch die auf Grund des Stroinlusses erfolgte Erwärmung verdunstet vom Streifen aus ständig Flüssigkeit trotz der Raumsättigung (die Sättigung mit Feuchtigkeit ist temperaturabhängig!). Dieses verdunstete Wasser kondensiert in erster Linie am kühlssten Ort des Raumes, hier also auf der dicht unter dem Streifen befindlichen Fläche des Kühlraumes.

Durch die Abrundung der Brücken können beim Abbiegen der nassen Streifen Rünche vermieden werden. Das ist wichtig, weil sonst der Sogeffekt durch Kapillarität in dem waagrecht liegenden Teil des Streifens beeinträchtigt wird. Die Folge davon wäre unter Umständen Zonenimperfection oder auch völliges Versagen der Trennung. In ihrer Lage festgehalten werden die Enden der Trennstreifen durch Ringgummi. Diese werden über die in den Puffer tauchenden Enden der Brücke gestreift. Durch Einschnitte an den entsprechenden Brückenenden wird verhindert, dass die Gummiringe abgleiten.

Die Trennung im Kartonpapier erfordert unbedingt eine Kühlung. Zu diesem Zweck ist der mittlere Teil der Kammer als Kühlraum ausgebaut. Zufluss und Abfluss der Kühlflüssigkeit sind auf der Seite durch Rohransätze angebracht und zwar der Zufluss mit engem, der Abfluss mit weiterem Durchmesser, wobei das Abflussrohr höher gelegen ist und zwar sein oberer Rand in gleicher Höhe mit der Deckwand des Kühlraumes. Dadurch kann, wenn der Raum mit Kühlflüssigkeit gefüllt ist, durch leichtes seitliches Anheben der Kammer eine völlige Entfernung der Luft bewirkt werden. Dadurch wird eine stets gleichmässige Konvektionskühlung der Deckwand gewährleistet. Dazu genügt im allgemeinen fließendes Leitungswasser. Es muss nur je nach Jahreszeit der Durchfluss entsprechend reguliert werden. Die durch die Konvektion verursachte Herabsetzung der Temperatur genügt vollständig, weil ja die Trennstreifen auf den Brücken dicht über der Deckwand des Kühlraumes liegen. Ebenso wird in dem Teil, in den die Streifenenden einstecken, durch Konvektion von der seitlichen Wand der Puffer gekühlt. So bleibt die Temperatur, auch wenn Versuche durch mehrere Stunden bei höherer Spannung gemacht werden - wie die Messungen gezeigt haben -, dann unter 25° C, wenn bereits längere Zeit vor Beginn des Versuchs die Kammer vorgekühlt worden ist und wenn für ausreichende Wasserzirkulation im Kühlraum gesorgt wird. Bei besonderen Versuchen, etwa wenn bestimmte Kartonpapiere mit höherem inneren Widerstand verwendet werden sollen oder wenn die Spannung erhöht wird, kann eine hö-

here Temperatur entstehen. Umgekehrt kann zum Beispiel bei Trennung von Fermentproteinen eine niedrigere Temperatur nötig sein. Diesen Anforderungen kann man gerecht werden, indem man die Kammer in einem gekühlten Raum (etwa $+ 4^{\circ}\text{C}$) aufstellt. In diesem Fall benützt man zur Konvektionskühlung eine Kühlsole; diese Sole lässt sich bis zu -30°C konstant halten. Wenn man bei dem Versuch auf Spannungen über 200 V und auf verkürzte Trennzeiten verzichtet, lässt sich nach unserer Erfahrung selbst eine Temperatur unter 15°C über lange Zeit halten. Bei Serumentrennungen, wie sie bei uns in erster Linie vorgenommen worden sind, ist es möglich, bei entsprechender Vorkühlung vor dem Versuch mit gewöhnlicher Leitungswasserkühlung auszukommen. Die Gefahr von Denaturierungen besteht dabei nicht.

Kartonpapiere.

Die Frage, wie sich die verschiedenen Sorten von Kartonpapieren für dieses Verfahren verwenden lassen, hat uns besonders beschäftigt. Es wurde eine grosse Menge von Kartonpapieren untersucht. In Tabelle 1 sind diejenigen Sorten zusammengestellt, die wir nach unserer Erfahrung für unsere Zwecke als besonders geeignet erkannt haben.

Die Dicke der zur Verwendung geeigneten Kartonpapiere hat ihre Grenzen. So kann man nicht etwa Kartonpapiere mit einer Dicke von mehr als 3 mm verwenden, weil sonst nicht mehr dafür garantiert werden kann, dass die in dem Streifen entstehende Wärme richtig abgeleitet wird. Ferner lässt sich die Gefahr von Zonenimperfectionen bei so dickem Querschnitt nicht vermeiden. Schliesslich muss bei derart starkem Papier bei der Serumapplikation eine Rinne eingeschnitten werden, in die dann das Serum, das vorher mit Cellulosepulver zu einem Brei angerührt werden muss, einzustreichen ist. Das ist einmal sehr umständlich und zum andern bewirkt es leicht zusätzliche Fehler. Deshalb haben wir gewöhnlich darauf verzichtet, Papiere zu verwenden, die stärker sind als es bei der aufgeführten Sorte 2696 Schleicher & Schüll der Fall ist. So haben wir zum Beispiel den Versuch mit dem bis zu 4,2 mm dicken Karton Nr. 2181 Schleicher & Schüll gemacht und dabei festgestellt, dass es nur für bestimmte Zwecke und nur ganz begrenzt verwendet werden kann (siehe Tabelle 1, letzte Spalte).

Bei unseren Brücken können Trennstreifen bis zu einer Breite von 18 cm verwendet werden. Die Verwendung noch breiterer Streifen hat ergeben, dass es dann nur sehr schwer möglich ist, Zonenimperfectionen zu vermeiden; ganz abgesehen davon, dass Streifen von solcher Breite auch die Auftragung sowie die Lokalisation der Zonen sehr erschweren. Deshalb erscheint nach unserer Erfahrung eine Begrenzung der Breite mit höchstens 18 cm angemessen. Bei unseren weiteren Versuchen haben wir uns lediglich auf zwei Formate beschränkt: Auf $30 \times 8\text{ cm}$ und $30 \times 15\text{ cm}$. Die maximalen Auftragsmengen, die in Tabelle 1 angegeben sind, beziehen sich jeweils auf eine Streifenbreite von 8 cm. Verwendet man Streifen mit einer Breite von 15 cm, so kann man wohl die doppelte Serummenge

TABELLE 1

Hersteller	Sorten- bezeichnung	Rohstoff	Herstellungs- art	Flächen- gewicht g/m ²	Dicke mm	mm n. Klemm	% Asche	% Eisen	Säurestoff mg/100 g	Ätherextrakt mg/100 g	Leistungsangaben für die Kartonsorten		
											Auf- tragung ml*)	Saug- fähig- keit	Trenn- er- gebnis
Fa. Harzfeld/Eder	152	Baumwolle 100%	Maschinenpapier Langsieb glatt	405	0.95—1.11 M.: 1.03	schnell saugend	0.13	—	ca. 4.0	—	0.6	gut	sehr gut
	157	Baumwolle 100%	Maschinenpapier Langsieb glatt	298	1.58—1.76 M.: 1.69	schnell saugend	0.21	—	ca. 4.5	—	1.2	gut	gut
	157 neu	Baumwolle 100%	Maschinenpapier Langsieb glatt	640	1.79—1.98 M.: 1.88	schnell saugend	0.21	—	ca. 4.5	—	1.2	gut	sehr gut
	K/12 op	Baumwolle 100%	Maschinenpapier Langsieb glatt	519	1.67—1.69 M.: 1.68	schnell saugend	0.21	—	ca. 4.5	—	1.0	sehr gut	ausge- zeichnet
Fa. Maderer, Düren/Rhld.	827	Baumwolle 100%	Maschinenpapier maschinenglatt	270	0.70	140	0.05 —0.08	ca. 0.002	—	unter 50	0.4	sehr gut	sehr gut
	866	Baumwolle 100%	Maschinenpapier maschinenglatt	650	1.70	155	0.05 —0.08	ca. 0.008	—	unter 50	1.0—1.2	sehr gut	ausge- zeichnet
Fa. Schleichner u. Schull, Dassel	2071	Baumwolle 100%	handgeschöpft, nachträglich geglättet	630 —680	0.65—0.70	65—70	0.04 —0.07	ca. 0.001 —0.002	ca. 1.0 —1.5	unter 50	0.8	mäßig	sichere letzte Spalte
	2230	Baumwolle 100%	handgeschöpft, nachträglich geglättet	700 —750	0.88—0.93	160—170	0.04 —0.07	ca. 0.001 —0.002	ca. 1.0 —2.0	unter 50	1.0	gut	sehr gut
	2695	Baumwolle 100%	handgeschöpft, nachträglich geglättet	1300 —1600	2.3 — 2.8	150—200	ca. 0.08	ca. 0.002	unter 20.0	unter 50	2.0—2.5	sehr gut	ausge- zeichnet
	2181	Baumwolle 100%	handgeschöpft, nachträglich geglättet	2400 —2500	3.6 — 4.2	—	0.04 —0.07	ca. 0.001 —0.002	ca. 1.0 —1.5	unter 50	3.0—4.0	sichere letzte Spalte	sichere letzte Spalte

Eigenschaften und Leistungsdaten der für die präparative Papierelektrophorese geeigneten Kartonsorten.

* = maximale Auftragsmenge von Serum in ml (die Angaben in dieser Spalte beziehen sich auf eine Streifenbreite von 8 cm. Für eine Streifenbreite von 15 cm muss dieser Wert verdoppelt werden).

- = Werte nicht bekannt.

auftragen, aber es entstehen bereits Schwierigkeiten bei der Auftragung bezüglich der Gleichmässigkeit, die ihrerseits wiederum zu Zonenimperfektionen führen können.

Im allgemeinen gibt es bei dünneren Kartonpapieren schärfere Trennungen. Es ist das nur natürlich, denn dabei entwickelt sich weniger Joule'sche Wärme und auch alle anderen Fehlermöglichkeiten sind geringer.

Wir haben immer die Papiere gewählt, die sich uns für die jeweiligen Zwecke als die geeignetsten erwiesen haben. Hatten wir grosse Serumengen zu trennen, dann machten wir mit dem Karton Nr. 2695 Schleicher & Schüll die besten Erfahrungen. Es gelang uns mit diesem Karton bei 15 cm Streifenbreite, bis zu 15 cm³ Serum beziehungsweise (bei normalem Serumeiweissgehalt) bis zu 1 g Eiweiss zu trennen. Die Güte der Trennungen ist dabei fast gleich derjenigen, die wir bei knapp halber Auftragsmenge mit den Kartonsorten Nr. 157 "neu" Binzer und K/12 o.P. Binzer oder mit Nr. 866 Macherey & Nagel erhalten haben. Besonders der letztere Karton hat uns bei einer Auftragsmöglichkeit von maximal 2,4 cm³ Serum bei einer Streifenbreite von 15 cm meistens die besten Trennungen geliefert. Deshalb haben wir diese Sorte bei den meisten unserer Versuche verwendet. Durchaus brauchbar zeigte sich für mittlere Auftragsmengen auch Nr. 2230 Schleicher & Schüll. Allerdings war es dabei schwieriger, die α_1 -Globulin-Fraktion zu isolieren als es bei den anderen Kartonsorten mit gleicher maximaler Auftragsmenge möglich war. Die Sorten Nr. 827 Macherey & Nagel und Nr. 152 Binzer erwiesen sich dann als besonders geeignet, wenn es galt, zweite Trennläufe noch uneinheitlicher Rohfraktionen vorzunehmen und vor allem die α_1 -Globulin-Fraktion herauszutrennen. Allerdings lässt sich dabei nur höchstens die Hälfte der Eiweissmenge auftragen.

All diese Papiere, die sich gut verwenden liessen, bestanden aus reinem Baumwollmaterial. Sie unterschieden sich nur dadurch, dass die einen Maschinenpapiere waren, die andern handgeschöpft. Die Maschinenpapiere waren maschinenglatt, die handgeschöpften nachgeglättet. Dabei machten wir die Erfahrung, dass, wenn die Papiere zu stark ge glättet waren, die Saugfähigkeit oft eine wesentlich geringere war und dass ferner bei ge glätteten und gepressten Papiersorten während der Versuche die Streifen stärkere Adsorption aufwiesen. Es ist wohl möglich, dass daher schnell wandernde proteingebundene Lipotide von weichen Papiere n nur in geringerem Masse adsorbiert werden als von den stärker ge glätteten und gepressten des gleichen Stoffes. Schon H.E. Schultze und H. Biel haben darauf aufmerksam gemacht, dass eine α_1 -Lipoproteid-Fraktion, etwa in analytischem Elektrophoresepapier, gleich nahe an der Auftragstelle zum grössten Teil adsorbiert wird, während bei Verwendung von Kartonpapier keine Adsorption beobachtet wurde.

Für die präparative Papirelektrophorese eignen sich nur Papiersorten mit hoher Saugfähigkeit. Berechnet nach Klemm beträgt die Saughöhe um oder über 140 - 150 mm. Manche Papiersorten lassen sich schon allein auf Grund ihrer hohen elektroosmotischen Eigenschaften nicht verwenden. Im Gegensatz zu den Pa-

piersorten, die für die analytische Papierelektrophorese gebraucht werden, weisen die in Tabelle 1 angegebenen Sorten stärkere Elektroosmose auf. Deshalb muss bei Trennungen auf Kartonpapier das Serum möglichst nahe der Mitte aufgetragen werden. Die γ -Fraktion wandert hier in Richtung der Kathode. Diese Eigenschaft der Kartonpapiere ist im allgemeinen nicht gerade erwünscht, aber bei bestimmten Versuchen kann man sie gut gebrauchen, so etwa bei Trennungen schnell wandernder Fraktionen. Diese Eigenschaft haben wir uns zunutze gemacht, indem wir bei der Trennung von γ -Globulin-Fraktionen aus einer durch Fällungsverfahren gewonnenen Rohfraktion den Karton Nr. 157 Binzer verwendeten.

Man kann also nicht diesen oder jenen Karton als den am besten geeigneten bezeichnen. Es kommt vielmehr bei der Wahl des brauchbarsten Kartons an auf den Zweck der Trennung oder auf die Grösse der Eiweissmenge, die getrennt werden soll, oder auf die Besonderheiten (Beweglichkeitseigenschaften) der zu trennenden Fraktionen. Auf Tabelle 1 sind die verschiedenen Sorten aufgeführt, aus denen man leicht für die verschiedenen Trennungen den jeweils passenden Karton finden kann.

Auftragung.

Um eine einwandfreie elektrophoretische Trennung zu erreichen, ist Grundbedingung, dass das Serum möglichst gleichmässig aufgetragen wird. Hierzu nehmen wir eine Spezialpipette, die $0,2 \text{ cm}^3$ fasst. Die Aufnahmekapazitäten sind bei den einzelnen Kartonsorten verschieden. Sie sind in Tabelle 1 angegeben. Es lässt sich nicht verhindern, dass dabei Diffusionszonen bis zu einer Breite von 2 cm entstehen. Durch eine derart breite Auftragszone würde jede ordentliche Trennung unmöglich gemacht. Durch die von uns im folgenden dargestellte Art der Auftragung werden sowohl die in Tabelle 1 angegebenen maximalen Auftragsmengen als auch eine gute Trennung erreicht. Wir tragen je die Hälfte des insgesamt aufzutragenden Serums auf die Ober- und Unterseite des Kartons auf, wobei an jeder Seite etwa 0,5 cm freibleiben. Bei einer Auftragung bis zum Rand würden im Laufe des Trennungsvorgangs Randschlieren entstehen, die eine Verunreinigung der Fraktionen zur Folge hätten. Eine optimale Applikation wird auf folgende Weise erreicht: Man legt ein Kunststofflineal quer über den Karton in der Weise, dass die abgeschrägte Fläche dem Karton zugewandt ist und ihre äussere Kante frei und genau über der Auftragsstelle steht. So kann ein gerader Strich in gleichmässiger Geschwindigkeit gezogen werden, wobei gleichzeitig ein Verlaufen infolge etwaiger Berührung der Pipettenspitze mit dem Lineal vermieden wird. Da erfahrungsgemäss bei jedem Ziehen des Striches die Anfangsgeschwindigkeit höher als die am Ende ist, jedoch das Serum aus der Pipette mit konstanter Gleichmässigkeit fliesst, ergibt sich zwangsläufig eine sich gleichmässig steigende Auftragsmenge. Wird in gleicher Weise, jedoch in entgegengesetzter Richtung auf der Rückseite aufgetragen, dann werden so die Auftragsdifferenzen wieder ausgeglichen und man gewinnt auf diese Weise eine völlig gleiche Applikation.

Das Serum wird auf den trockenen Karton aufgetragen, auf dem vorher die Auftragstelle durch Bleistiftstrich gekennzeichnet worden ist. Unmittelbar nach beendigter Auftragung wird der Karton von der anodischen Seite her in die Pufferlösung getaucht (Abbildung 3a), die vorher im Kühlschrank auf 2 - 4° C abgekühlt worden ist. Die Pufferfront steigt nun im Karton auf. Durch seitliches Neigen des Kartons kann die Pufferfront gerade gehalten und notfalls korrigiert werden. Wünscht man, dass der Puffer langsamer aufsteigt, so braucht der Karton nur steiler gehalten zu werden (Abbildung 3b). Auf diese Weise kann ein geradliniges Ansteigen gegen die Auftragszone erzielt werden. Aber kurz bevor diese erreicht ist, nimmt man den Karton schnell heraus. Dabei ist folgendes besonders zu beachten: Würde man jetzt den Karton um 180° drehen, um die andere Seite einzutauchen, dann würde unweigerlich der noch im Überschuss am Karton haftende Puffer an der Längskante entlanglaufen und durch Diffusion eine klare Trennung an den beiden Längsseiten unmöglich machen. Deshalb ist es notwendig, vor der Drehung des Kartons die überschüssige Pufferflüssigkeit rasch, aber doch einigermaßen gründlich ablaufen zu lassen. Erst dann wird der Streifen mit seiner anderen Seite eingetaucht. Mittlerweile hat von der anodischen Seite her die Pufferfront die Diffusionszone bereits zurückgeschoben (Abbildung 3c). Da die andere Seite des Streifens nunmehr eingetaucht ist, drängt die hier ebenfalls aufsteigende Front die Diffusionszone zusammen und es entsteht dadurch schliesslich eine nur wenige Millimeter breite Auftragslinie (Abbildung 3d). Der Vorzug bei dieser nur wenige Millimeter breiten Auftragszone gegenüber der präparativen Elektrophorese im homogenen Medium mit ihrer mehrere Zentimeter breiten anfänglichen Serum-Puffer-Gemischzone liegt auf der Hand: Es wird einmal der Trennungsweg kleiner gehalten, zum andern ist die Trennzeit eine wesentlich kürzere (Näheres siehe oben Seite 8).

Da zu diesem Verfahren eine gewisse Übung unerlässlich ist, dürfte es zweckmässig sein, wenn man sich zuerst mit einem stark Bilirubin-haltigen Serum versucht. Es wird dadurch eine gute Sichtkontrolle gewährt.

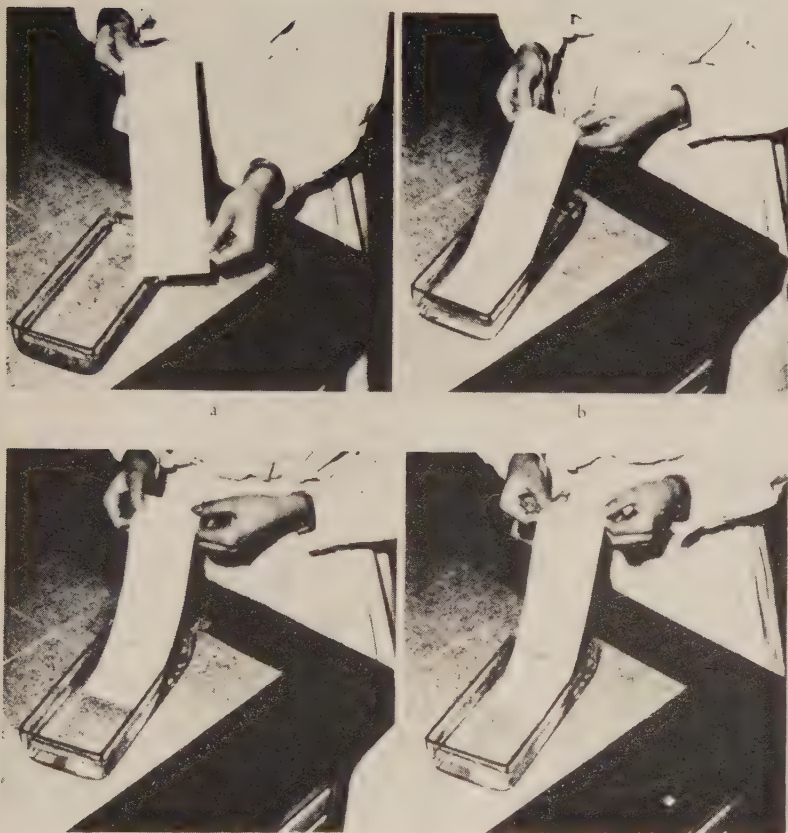
Hat man in dieser Weise aufgetragen und die Diffusionszone eingeeengt, dann legt man den Streifen auf die Brücke und biegt ihn an den beiden Enden vorsichtig ab. Es muss dabei darauf geachtet werden, dass der Karton nicht bricht. Mit den bereits oben erwähnten Gummiringen werden die Enden des Streifens festgehalten und nun kann man die Brücke in die Kammer einsetzen. Die Auflage des Deckrahmens mit dem Deckkarton ist aus Abbildung 2 zu ersehen.

Puffer.

Als Puffer für präparative Trennungen bei dem auch bei der analytischen Papierelektrophorese üblichen p_H -Wert von 8,6 verwenden wir den nach L. Michaelis. Er ist folgendermassen zusammengesetzt:

Veronal-Natrium	29,43 g
Natriumazetat ($\cdot 3 H_2O$)	19,43 g
n/10 HCl	180,0 cm ³
Aqua bidest	ad 3000,0 cm ³

ABBILDUNG 3a - d



Einengung des auf dem Kartonstreifen diffundierten Serums mit Hilfe von Pufferlösung.

Für unsere Zwecke muss dieser Stammpuffer immer verdünnt werden und zwar bei einem Potentialgefälle bis zu 8 V/cm Kartonstreifen im Verhältnis 1 : 1, bei über 8 - 12 V/cm eine noch etwas höhere Verdünnung, etwa 3 : 2. So hat es sich bei uns jeweils als bestes Verdünnungsverhältnis erwiesen, kann aber nicht als strenge Regel angesehen werden. Viel wichtiger ist eine genaue Abstimmung des gegenseitigen Verhältnisses von Karton, Spannung und Pufferzusammensetzung, um einen optimalen Trenneffekt zu erreichen. Das muss von Fall zu Fall immer erst ausprobiert werden. Es ist zum Beispiel durchaus möglich, dass bei dünneren Kar-

tonsorten mit einem Spannungsgefälle bis zu 12 V/cm auch bei einer Verdünnung von 1 : 1 getrennt wird und man dabei sehr scharfe Fraktionszonen bekommt.

Somit lässt sich sagen: Bei niedriger Spannung, längerer Trennzeit und stärkerer Verdünnung des Puffers wird wohl eine weiter auseinandergezogene, aber umso weniger scharf begrenzte Trennung erreicht. Umgekehrt bei höherer Spannung, weniger starker Verdünnung des Stammpuffers und kürzerer Trennzeit wird die Trennung zwar weniger weit auseinandergezogen, aber die einzelnen Zonen sind schärfer gegeneinander abgegrenzt. Ändert man nun je nach Bedarf den einen oder anderen der drei Faktoren, dann lässt sich je nach Wunsch und Fragestellung der Trennungsablauf steuern.

Es lässt sich natürlich auch mit anderen Pufferzusammensetzungen bei anderem p_H -Wert arbeiten. Angenommen, wir erhalten bei einem p_H -Wert von 8,6 eine einheitliche Fraktion, dann ist es unter Umständen durchaus möglich, diese bei einem anderen p_H -Wert in zwei oder drei Fraktionen aufzutrennen. Dazu aber ist es erforderlich, dass man die beim ersten Präparationslauf erhaltene Fraktion zuvor genügend lang gegen die gewählte Pufferlösung dialysiert. Bei einer erstmaligen Serumauftrennung dagegen ist eine Dialyse gegen den entsprechenden Puffer nicht notwendig.

Je nachdem, welchen Puffer man nun nimmt, ist es möglich, die Trennergebnisse, die von der freien Elektrophorese her bekannt sind, auszuwerten. Man kann zum Beispiel bei einer Trennung mit einem p_H -Wert von 4,1 - 4,5 elektrophoretisch einheitliche, den übrigen Proteinen rasch vorauswandernde Fraktionen erhalten. Bei der chemischen Untersuchung lassen diese sich als Glykoproteide identifizieren. Über die Merkmale ihrer Beweglichkeit bei der freien Elektrophorese haben schon H.E. Weimer, J.W. Mehl und R.J. Winzler berichtet. H.E. Schultze und H. Biel haben derartige Fraktionen mit präparativer Zonelektrophorese erhalten, nachdem sie zuvor die Rohfraktion durch Fällung (H.E. Schultze und Mitarbeiter) gewonnen hatten.

Stromversorgung und verwendete Spannung.

Die Firma J. Hirschmann, München hat nach unseren Angaben ein Allzweck-Aggregat gebaut, von dem wir für unsere präparativen Versuche den Strom entnehmen. Mit diesem Transformator ist es möglich, alle Arbeiten (ausser der Hochspannungselektrophorese), die in unserem Eiweisslaboratorium durchgeführt werden, mit Strom zu versorgen. Diesem Gerät können die verschiedenen Spannungen je nach Wahl entnommen werden. Dabei können gleichzeitig bis zu sieben Einzelabnahmen mit jeweils völlig verschiedenen Werten zwischen 0 - 800 V und 0 - 2000 mA vorgenommen werden und jede getrennt stufenlos reguliert werden.

Mit diesem nach unseren Angaben gebauten Gerät können wir die Spannungen wählen, die sich für unsere Trennungen als besonders günstig erwiesen haben. Wir haben dabei gefunden, dass das Potentialgefälle auf dem Kartonstreifen im allgemeinen zwischen 6 - 12 V/cm liegt. Die Stromstärke richtet sich nach der

Qualität und dem Querschnitt des Kartons sowie nach der Molarität des Puffers, der dabei verwendet wird; sie schwankt von 10 - 40 mA pro Streifen.

Trennzeiten.

Die Trennungsdauer hängt natürlich davon ab, mit welcher Spannung und Puffermolarität gearbeitet wird und welche Kartonsorten Verwendung finden.

In Tabelle 2 sind zusammengestellt: Die bei den jeweils gewählten Spannungen resultierenden Stromstärkewerte, die Trennzeiten und Trennstrecken, bezogen auf die jeweils angewandte Kartonsorte. Wir haben dabei immer auf dem Streifen eine Potentialdifferenz von etwa 7 V/cm und einen im Verhältnis 1 : 1 verdünnten Stammpuffer gewählt. So weit auseinandergezogene Trennungen, wie sie in Tabelle 2 angegeben sind, wird man allerdings für normale präparative Trennungen nicht brauchen. Sie wären auch nicht günstig, denn je weiter die Trennstrecke wird, desto mehr nimmt die Schärfe der Fraktionen ab. Im allgemeinen genügen Trennzeiten von 8 - 12 Stunden und Trennstrecken von 9 - 11 cm. Damit sind die günstigsten Werte gegeben. Wählt man für besondere Versuche ein Potentialgefälle auf dem Karton bis zu 12 V/cm, so treten erhöhte Joule'sche Wärme und Stromstärken bis zu 40 mA pro Streifen auf - auch bei stärkerer Verdünnung des Puffers. Dabei erreicht man eine Trennzeit von etwa 6 - 8 Stunden und erhält dabei scharfe Fraktionsgrenzen. Allerdings sind unter diesen Bedingungen Trennstrecken über 10 cm nicht zu erreichen.

Lagebestimmung der Zonen.

Nun heisst es, aus dem Kartonpapier die Eiweissfraktionen zu gewinnen. Das ist nur durch Sichtbarmachung ihrer Lage möglich. Dazu verwenden wir das schon von R. Consden und Mitarbeiter benützte "Abklatschverfahren". Man wendet es folgendermassen an: der nasse Trennstreifen wird sofort nach der Trennung aus der Kammer herausgenommen, auf eine Glasplatte gelegt und auf ihn ein gleich grosser, aber trockener Streifen maschinenglattes dünnes Filtrierpapier aufgelegt. Wir verwenden dazu meistens die Sorte Nr. 261 Macherey & Nagel. Dieses Auflegen geschieht am besten in folgender Weise: Das trockene Filtrierpapier wird zunächst nur an der Vorderkante aufgelegt; diese beiden Kanten von Karton und Abklatschpapier müssen sich genau decken. Auf diese Kante legt man einen Glaszylinder mit einem Durchmesser von etwa 12 cm und rollt ihn durch gleichmässiges Schieben langsam nach hinten, wobei die andere Hand das hintere Ende des Papiers in gleichmässiger leichter Spannung hochhält (um Faltenbildung zu vermeiden), bis der ganze Streifen in dieser Weise auf den Karton aufgewalzt ist. Hierbei wird von dem darunterliegenden nassen Karton immerhin so viel Puffer mit jetzt getrenntem Eiweiss aufgesaugt, dass ein Abklatsch entsteht. Der Abklatschstreifen wird sofort abgenommen und in der Trockenkammer bei etwa 120° C getrocknet und gefärbt. Dazu verwendet man eine gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10 B in Methanol mit 10 % Eisessig. Anstelle von Amidoschwarz wurde auch Azokarmin B und Supra-

TABELLE 2

Karton-Sorte	Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Trennzeit (Std.)	Trennstrecke (cm)
152 Bi	180	12	16	16,0
157-neu Bi	180	17	16	16,0
K/12 oP Bi	180	17	16	15,0
827 M & N	180	11	10	12,5
866 M & N	180	19	14	13,0
2071 S & S	180	9	16	9,5
2230 S & S	180	16	16	13,5
2695 S & S	180	23	16	13,5
2181 S & S	180	24	16	10,0

Bedingungen und Trennergebnisse in Abhängigkeit von verschiedenen Kartonsorten.

minblau auf ihre Brauchbarkeit erprobt. Beide haben den Vorzug, dass sie sich anschliessend rascher wieder entfärben lassen; die Zeitersparnis hierbei beträgt etwa 50 % der Entfärbungszeit bei Verwendung von Amidoschwarz als Färbemittel. Eine beschleunigte Entfärbung wird auch erreicht, wenn man dem sonst üblichen Entfärbebad (Methanol und Eisessig im Verhältnis 9 : 1) noch eine geringe Menge Wasser und eventuell auch etwas Phenol zusetzt.

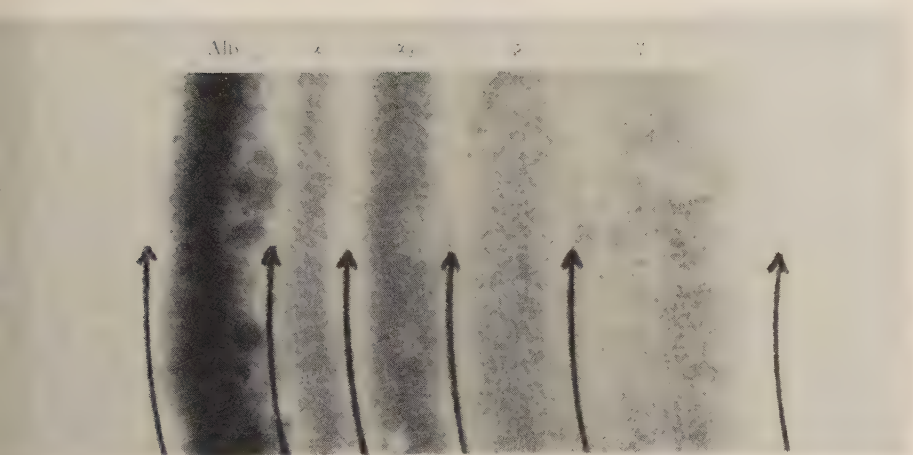
Über den Kartonstreifen selber wird unmittelbar nach erfolgtem Abklatsch eine zweite Glasplatte gelegt, die ringsum mit einer Glasleiste von etwa 1 cm Stärke versehen ist. Dadurch werden die Streifen nach aussen hin völlig abgeschlossen und es bildet sich sehr bald eine feuchte Kammer aus, wodurch weiteres Abdunsten von den Streifen verhindert wird. Diese feuchte Kammer wird einstweilen im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt.

In Abbildung 4 ist ein derartiger Abklatsch zu sehen. Für spezielle Untersuchungen von Lipoproteiden oder Glykoproteiden kann man den Abklatsch nach den Methoden von B. Swahn beziehungsweise E. Köiv und A. Grönwall anfärben.

Gewinnung der Reinfractionen aus dem Papier.

Die Zonen der einzelnen Fraktionen im Kartonstreifen werden nach dem Abklatsch sorgfältig herausgeschnitten. Die rotierende Klinge, wie sie H.E. Schultze und H. Biel für notwendig erklären, kann bei einiger Übung und Sorgfalt durch jede gut schneidende Schere ersetzt werden. Es muss beim Zerschneiden nur streng darauf geachtet werden, dass es für jeden einzelnen Kartonstreifen genau nach dem dazugehörigen Abklatsch durchgeführt wird. Der Schnitt muss jeweils an den Stellen des Eiweissminimums zwischen zwei Fraktionen, also entsprechend den hellsten Partien des Abklatsches durchgeführt werden. Ohne genaues und sorgfältiges Arbeiten hierbei ist eine Gewinnung möglichst einheitlicher Fraktionen nicht mög-

ABBILDUNG 4



Abklatsch. Die Pfeile zeigen die Schnittlinien bei der Isolierung der Fraktionen. Die Serumtrennung erfolgte auf Kartonpapier 866 MN. Der Puffer wurde zu gleichen Teilen mit Aqua bidest. verdünnt. Angelegte Spannung 220 V, Trennzeit 10 Stunden, Trennstrecke 12 cm, Abklatsch auf Papier 261 MN.

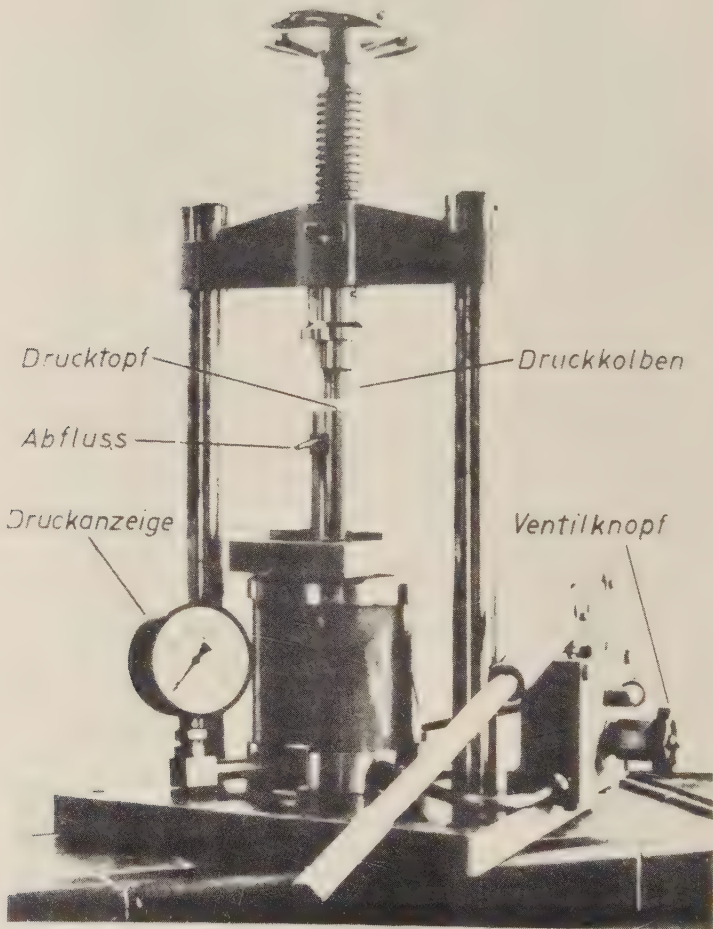
lich. Will man bei einzelnen Fraktionen nur enge Maximabereiche gewinnen, so wird ein schmaler Streifen in der Mitte zwischen den Fraktionen verworfen.

Die einander entsprechenden Abschnitte des gleichen Serums werden gesammelt. Eine Proteingewinnung durch Elution aus diesen Kartonabschnitten wäre unrentabel, vor allem dann, wenn man eine möglichst hohe Ausbeute erzielen möchte. Ferner würde man dabei eine derart hohe Verdünnung bekommen, die dann durch langwieriges Einengen erst wieder beseitigt werden müsste. Daher haben wir einen anderen Weg beschritten. Wir haben die noch mit Puffer verdünnten Fraktionen bei hohem Druck aus den Kartonabschnitten ausgepresst. Wir benützten dazu eine hierfür sehr gut geeignete hydraulische Presse (Abbildung 5; hergestellt von der Firma P. Weber, Stuttgart-Uhlbach). Damit können bei einem Druck bis zu 20 t die Eiweissmengen weitgehend wiedergewonnen werden.

Die Presse ist so konstruiert, dass ein Stempel, der sich am unteren Ende einer vertikalen Spindel befindet, durch Drehen dieser Spindel in einen darunter angebrachten und ihm genau angepassten Drucktopf eingeführt wird. Der Drucktopf ist auf einer Hebebühne festgemacht und hat rings in seiner Innenwand im oberen Teil eine Hohlrinne eingedreht, die etwa nach oben drängende Flüssigkeiten in sich aufnimmt und durch den vorne angebrachten Abflussschlitz mit abfließen lässt.

ABBILDUNG 5

Presse für präparative Zonen-Elektrophorese
auf Kartonpapier.



Hydraulische Presse zur Gewinnung der Eiweissfraktionen aus den Kartonabschnitten.

Unterhalb dieses Schlitzes ist die Abflussrinne angebracht, durch die man die Pressflüssigkeit in geeignete Sammelgefässe ablaufen lassen kann.

Nach leichtem Anpressen des Stempels von oben her wird auf hydraulischem Weg der Drucktopf von unten gegen ihn gepresst, solange bis das Manometer 20 t anzeigt. Die Pumpe der hydraulischen Presse wird mit der Hand mittels eines langen Hebelarmes betätigt.

Die auf diesem Wege ausgepressten Kartonplättchen werden nun nochmals in physiologischer Kochsalzlösung aufgeweicht und nach einiger Zeit erneut ausgepresst. Es gelingt bei solcher zweimaliger Auspressung und bei maximalem Druck (20 t), bis zu 90 % der aufgetragenen Eiweissmenge wieder zu gewinnen. Diese Ausbeute konnte experimentell mit bekannten Mengen von Albumin und γ -Globulin nachgewiesen werden.

Eiweissgehalt, Dialyse.

Natürlich ist der Eiweissgehalt jeder so gewonnenen Fraktion ein verschiedener. Da im allgemeinen sowohl der Gesamteiweissgehalt im Serum als auch dessen prozentuale Verteilung auf die einzelnen Fraktionen bekannt sind, kann man einerseits hieraus, andererseits aus der Grösse des ausgeschnittenen Streifens die Eiweisskonzentration in der ausgepressten Flüssigkeit annähernd ermitteln. Dies ist deshalb möglich, weil innerhalb jeder der verwendeten Kartonsorten die Pufferaufnahme mit nur ganz geringen Schwankungen konstant bleibt. Die höchste Konzentration besitzt beim Normalserum das Albumin. Engere Trennzonen haben die α - und β -Globulin-Fraktionen. Infolge ihres niedrigeren absoluten Eiweissgehaltes im Ausgangsserum ist ihre Eiweisskonzentration jedoch niedriger als die der ausgepressten Albuminfraktion. Beim Normalserum lässt sich deutlich feststellen, dass auch die Konzentration der γ -Globulin-Fraktion, die auf einen grösseren Kartonschnitt ausgedehnt ist, niedriger ist. Wenn jedoch eine der gewonnenen Globulin-Fraktionen im Ausgangsserum stark erhöht ist, dann ändert sich auch dieses Verhältnis. So ist beim Cirrhose-Serum eine stärkere Albumin-Abnahme und eine Vermehrung der γ -Globuline vorhanden. Bei präparativer Trennung eines derartigen Serums ist auch die Konzentration der gewonnenen γ -Globulin-Fraktion nach dem Auspressen am höchsten. Im allgemeinen kann damit gerechnet werden, dass in den ausgepressten Eiweissfraktionen Konzentrationen zwischen 0,5 % und 1,0 % vorhanden sind, während bei Albumin bis zu 2,0 % erreicht werden kann. Viel konzentrierter sind bei Plasmocytomen die Paraprotein-Fraktionen. Infolge ihrer Homogenität wandern sie sehr eng begrenzt und können demzufolge in Konzentrationen bis zu 5,0 % gewonnen werden.

Für viele Untersuchungen ist eine weitere Konzentrierung nicht mehr nötig. Es kann vorkommen, dass durch die Puffersalze Störungen auftreten. In solchem Fall muss erst dialysiert werden und zwar lässt sich Albumin gegen Aqua destillata dialysieren, wogegen γ -Globuline gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert werden müssen, um eine teilweise Ausfällung der γ -Globuline zu vermeiden.

Will man von Puffersalzen völlig gereinigte Fraktionen erhalten, dann muss die Dialysierflüssigkeit des öfteren gewechselt werden. Nach Beendigung der Dialyse ist es immer empfehlenswert, dass die Fraktionen filtriert werden. Dazu lässt sich langsam filtrierendes Glasfaserpapier, ein Kunststofffilter oder eine Glasfritte verwenden. Diese empfehlen ganz besonders H.E. Schultze und H. Biel, wenn es gilt, feinste Cellulosefasern zu entfernen, die sich vom Kartonpapier gelöst haben und bei späteren chemischen Untersuchungen störend wirken können. Durch Zentrifugieren lassen sie sich nicht beseitigen, sondern werden beim Auslaufen nur wieder aufgewirbelt.

Einengung.

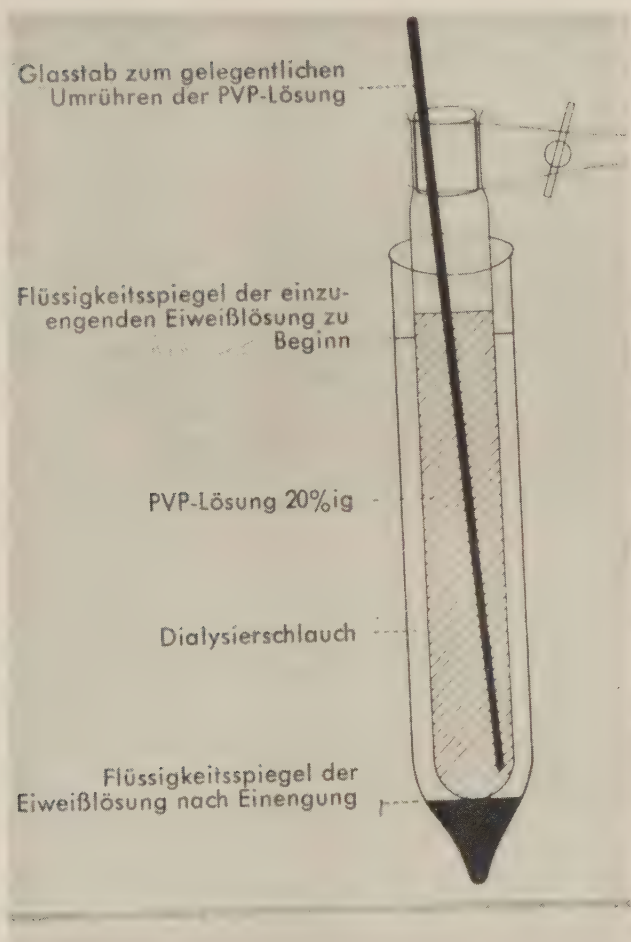
Wenn bei den gewonnenen Fraktionen die Eiweisskonzentrationen für die weiteren Untersuchungen nicht ausreichen, muss eingengt werden. Wir haben dabei mit den folgenden Verfahren gute Erfolge erzielt:

Die Firma Membranfiltergesellschaft Göttingen hat ein Gerät entwickelt, mit dem unter Anwendung eines Druckes von 15 Atmosphären (Pressluft oder Stickstoff) eine Druckfiltration durchgeführt werden kann. Innerhalb weniger Stunden gelingt es, auch wenn man grosse Ausgangsmengen hat, diese bis auf nur wenige Kubikzentimeter einzuengen. Bei wärmeempfindlichen Lösungen lässt sich die Einengung ohne weiteres im Kühltisch oder in einem Eiswasserbad durchführen. Bei der Druckfiltration markierter Albumine und γ -Globuline haben wir die Erfahrung gemacht, dass die Membranfilter Lsg. 60 für Eiweiss undurchlässig sind. Wenn das Druckfiltrationsgerät auf einer Schüttelvorrichtung ausreichend in Bewegung gehalten bleibt, kann die Einengung beschleunigt werden. Die Pufferionen werden dabei zum grossen Teil entfernt.

Die Einengung durch Dialyse gegen hochvisköse Lösungen geschah bei uns in der Weise, dass wir dazu eine Polyvinylpyrrolidon-Lösung (PVP 20 %ig zur Dialyse "Bayer") verwendeten. Dabei füllten wir die Eiweisslösung in einen Cellophan-Dialysierschlauch (Hersteller Firma Kalle & Co. Wiesbaden-Biebrich) und legten diesen Schlauch in die PVP-Lösung ein. Dieser Schlauch ist ein strukturloses, nahtloses Membranmaterial aus reinem Cellulosehydrat. Auch nach langer Dialyse gibt es bei diesem Schlauch keinen Durchtritt von Eiweiss. Dabei wird eine hohe Dialysiergeschwindigkeit erzielt. Eine Entfernung der Hauptmenge der Puffersalze muss auch hier mit der Einengung Hand in Hand gehen. Auch sie kann im Kühltisch durchgeführt werden.

Es ist möglich, diese beiden oben genannten Verfahren auch hintereinander durchzuführen. Sind etwa grosse Mengen von wenig konzentrierter Eiweisslösung zu verarbeiten, dann können sie erst durch Druckfiltration, dann mit PVP eingengt werden. Sind die Ausgangsmengen sehr gross, dann empfiehlt sich wenigstens als erste Stufe eine Druckfiltration, da sie rascher arbeitet. Es ist dringend ratsam, in jedem Fall danach noch einmal eine Dialyse dieser eingengten Eiweisslösungen gegen Wasser oder physiologische Kochsalzlösung durchzuführen. Dadurch

ABBILDUNG 6



Vorrichtung zum Einengen von Eiweißlösungen bis zu einem bestimmten Endvolumen.

werden dann auch die letzten Pufferreste entfernt. Im Anschluss daran wird nochmals hochtourig zentrifugiert und dann durch Glasfritten filtriert. Die dazu verwendeten Filter waren Elektrosyl-Filternutschen mit Korngrösse 4 g (Porenweite $9 - 15 \mu$) oder 4 f (Porenweite $3 - 8 \mu$). Es können auch Glasfritten von Schott und Gen. empfohlen werden, z.B. 17 G 5 auf 3.

J. Kohn (Queen Mary's Hospital, Roehampton, England) hat auf die Möglichkeit hingewiesen, wie man auch kleine Mengen von Eiweisslösungen auf ein vorher bestimmtes Endvolumen einengen kann. Für gewöhnlich wird die Lösung in die Dialysierschläuche gefüllt und mit diesen in eine Aussenflüssigkeit gelegt. Hier aber ist das Verfahren umgekehrt (Abbildung 6). Die stark konzentrierte PVP-Lösung wird in den Dialysierschlauch gefüllt. Dieser wird oben offen gelassen. Der Schlauch wird in ein Glasrohr mit unten befindlicher zapfenförmiger Vertiefung gehängt. Nun gibt man die einzuengende Lösung in das Glasrohr, in dem der Dialysierschlauch bereits hängt. Durch die Dialyse und Einengung erfolgt ein Sinken des äusseren Flüssigkeitsspiegels. Ist die Eiweisslösung so weit eingengt, dass ihr Spiegel beim unteren Ende des Schlauches angelangt ist, dann ist die Einengung abgeschlossen. Dadurch ist es möglich, jedes nur gewünschte Endvolumen schon vorher festzulegen, indem man einfach den Dialysierschlauch auf die entsprechende Höhe einstellt. Die zapfenförmige Vertiefung gestattet die Einengung auch kleinster Mengen. Durch einen von oben in den Schlauch eingeführten Glasstab, mit dem man die PVP-Lösung wiederholt umrührt, lässt sich der Einengungsprozess beschleunigen.

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DER BESCHRIEBENEN METHODE.

a) Charakterisierung der isolierten Fraktionen.

Die auf solche Weise aus dem Serum gewonnenen Fraktionen haben ein ganz bestimmtes charakteristisches Aussehen. So ist infolge seiner Vehikelbindung von Bilirubin das Albumin gelb gefärbt. Ohne besondere Farbcharakteristik ist die α_1 -Fraktion. Dagegen zeigt sich bei der α_2 -Fraktion wegen seines Coeruloplasmin-Gehalts ein grüner Farbton. Der β -Fraktion ist eisenbindendes Globulin beigemischt; dadurch erhält sie eine rötliche Farbe; sie ist aber manches Mal wegen ihres Lipidgehaltes leicht getrübt. Die an sich farblose γ -Fraktion zeigt einen leichten Tyndall-Effekt.

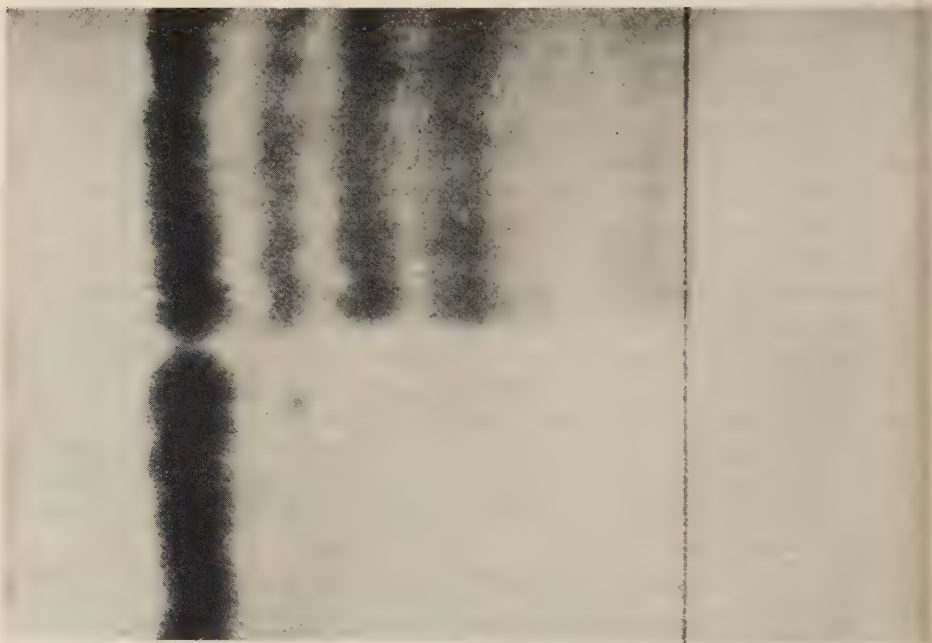
Am leichtesten lassen sich auf dem von uns beschrittenen Weg einheitliche Albumine und γ -Globulin-Fraktionen isolieren. Um diese Einheitlichkeit der Fraktionen, vor allem der übrigen Globulin-Fraktionen, zu erreichen, muss vor allem die Trennung genauestens durchgeführt und müssen die Fraktionen auf dem Trennstreifen gegeneinander klar abgegrenzt sein. Bei der Trennung von kleinen Eiweissmengen, zu der man nur einen einzigen Kartonstreifen braucht, geht es verhältnismässig leicht, einen hohen Reinheitsgrad der α - und β -Fraktionen zu erzielen. Schwieriger wird das jedoch bei grösseren Serummengen. Denn dazu müssen zur Gewinnung der einzelnen Fraktionen jeweils mehrere einander entsprechende Kartonabschnitte gesammelt und zusammen verarbeitet werden. Dadurch gibt es leicht Fraktionsverunreinigungen, da die Schnitte zwangsläufig relativ zu den Fraktionen verschieden sind und sich dadurch die Anteile der benachbarten Fraktionen - wenn auch nur geringfügig - verschieben. Deshalb müssen jedesmal

je nach Art der Fragestellung die optimalen Trennbedingungen gesucht und angewandt werden. Durch die Methode des "Gipfelschnittes" kann man unter Umständen die Einheitlichkeit der gewonnenen Fraktionen dadurch erhöhen, dass man Zonen, die zwischen den Fraktionen gelegen sind, teilweise verwirft. Wir haben dieses Verfahren lediglich angewandt, um herauszufinden, welche Möglichkeiten bei diesem Verfahren sich ergeben. Bei der Isolierung der Fraktionen, die hernach chemisch untersucht wurden, haben wir dieses Verfahren niemals angewandt. Verunreinigungen durch Nachbarfraktionen können auch durch einen zweiten Präparationslauf beseitigt werden, wobei man dann noch für jeden Lauf die geeignetste Kartonsorte wählen kann.

Meistens gelingt es besser, aus pathologischen Seren einheitliche Globulin-Fraktionen zu gewinnen als aus Normalserum; in den ersteren tritt nämlich sehr oft eine Erhöhung der einen oder anderen Fraktion auf. Vor allem können die α -Fraktionen leichter gewonnen werden, denn sie behalten auch bei stärkerer Vermehrung ihre schmalen Zonen bei; dadurch wird es umso eher möglich, sie gegeneinander abzugrenzen. Umgekehrt aber kann es gerade bei pathologischen Seren äußerst schwierig sein, zwischen β - und γ -Globulinen zu trennen, vor allem, wenn zwischen diesen eine Übergangszone besteht. Vor allem bei Erkrankungen der Leber hat man diese Erfahrung bereits mit der analytischen Papierelektrophorese seit längerem gemacht.

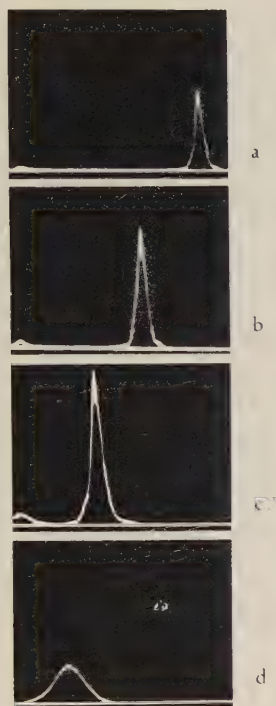
Die Kontrolle der Einheitlichkeit der durch präparative Elektrophorese gewonnenen Fraktionen muss zwangsläufig wieder durch Elektrophorese erfolgen. Wir wissen, dass die im Elektrophorese-Diagramm abgrenzbaren Globuline, die nach Tiselius als α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline bezeichnet werden, jede für sich nicht etwa nur aus einem einzigen Protein bestehen, sondern dass es ganze Gruppen von Eiweisskörpern sind, die die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese besitzen. Es konnte vor allem durch die Immunoelktrophorese die Heterogenität der Globulin-Fraktionen nachgewiesen werden. Daher können präparativ gewonnene Fraktionen - auch wenn sie sich bei einem Kontrolllauf nach einer analytischen Methode als einheitlich erweisen - als heterogen erkannt werden, wenn man sie auf anderen Wegen, etwa durch verschiedenartige Sedimentation in der Ultrazentrifuge oder in einem Fällungsverfahren, noch weiter untersucht. Das lässt sich besonders gut nachweisen mit immunologischen Untersuchungen, vor allem mit der ganz besonders empfindlichen Immunelektrophorese. Es ist sogar mit der gleichen präparativen Elektrophorese möglich - wenn man andere Puffer- und p_H -Verhältnisse anwendet - zu erreichen, dass eine Fraktion, die ursprünglich einheitlich war, in mehrere Komponenten zerlegt wird (siehe auch Seite 22).

Eine Kontrolle der elektrophoretischen Einheitlichkeit der isolierten Fraktionen ist nach einem der gängigen Verfahren, so zum Beispiel der analytischen Papierelektrophorese oder der U-Rohr-Methode nach Tiselius möglich. Abbildung 7 zeigt eine Gegenüberstellung von derartigen Kontrollläufen einer nach der Methode der präparativen Papierelektrophorese gewonnenen Albumin-Fraktion und ihres Ausgangsserums. Es ist hier klar zu erkennen, dass keine Verunreinigungen durch



Reinheitsprüfung. Untersuchung einer präparativ gewonnenen Albuminfraktion auf Einheitlichkeit mittels analytischer Papierelektrophorese auf einem breiten Streifen im Vergleich zum Ausgangsserum.

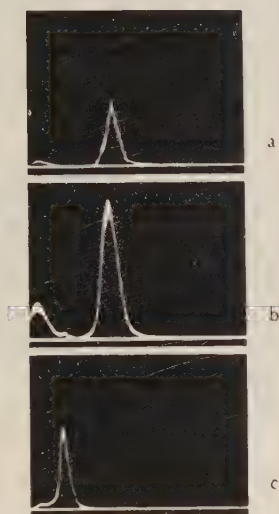
andere Fraktionen erfolgt sind. Ebenso ergab auch die Elektrophorese nach Tiselius bei dieser Albumin-Fraktion eine vollständige Einheitlichkeit. Allerdings können bei der analytischen Papierelektrophorese geringe Beimengungen von Nachbarfraktionen übersehen werden. Daher ist das Verfahren nach Tiselius, das derartige Verunreinigungen viel deutlicher erkennen lässt, zur Prüfung auf Reinheit der präparativ gewonnenen Fraktionen weit besser geeignet. Es ist uns nicht gelungen, einheitliche α_1 -Globulin-Fraktionen zu erhalten, bei denen nicht mit der freien Elektrophorese Beimengungen anderer Fraktionen, vor allem der Albumine, hätten nachgewiesen werden können. Das war auch so bei sorgfältigster Arbeit, auch dann, wenn wir unter besonderen Versuchsbedingungen einen zweiten Lauf vorgenommen haben - stets fanden sich gegen 10 % Beimengungen von Albumin. Hat man nun andererseits α -Rohfraktionen unter Verwendung von Michaelispuffer ($p_H = 8,6$) gewonnen und lässt diese Fraktion ein zweites Mal bei einem Puffer mit einem p_H -Wert von 4,1 - 4,5 wandern, so lässt sich hieraus noch eine ein-



Tiselius-Elektrophoresen
von gewonnenen Fraktionen.

Überprüfung der gewonnenen Fraktionen Albumin (a), α_2 -Globulin (b), β -Globulin (c) und γ -Globulin (d) auf Einheitlichkeit mit der Tiselius-Elektrophorese. Trennungen a und d in Makrozelle, Trennungen b und c in Mikrozele.

Die links in den Tiselius-Diagrammen vorgelagerten Zacken stellen nicht etwa Verunreinigungen dar, sondern es handelt sich hierbei lediglich jeweils um den Puffergradienten.



Tiselius-Elektrophoresen
von Paraprotein-Fractionen.

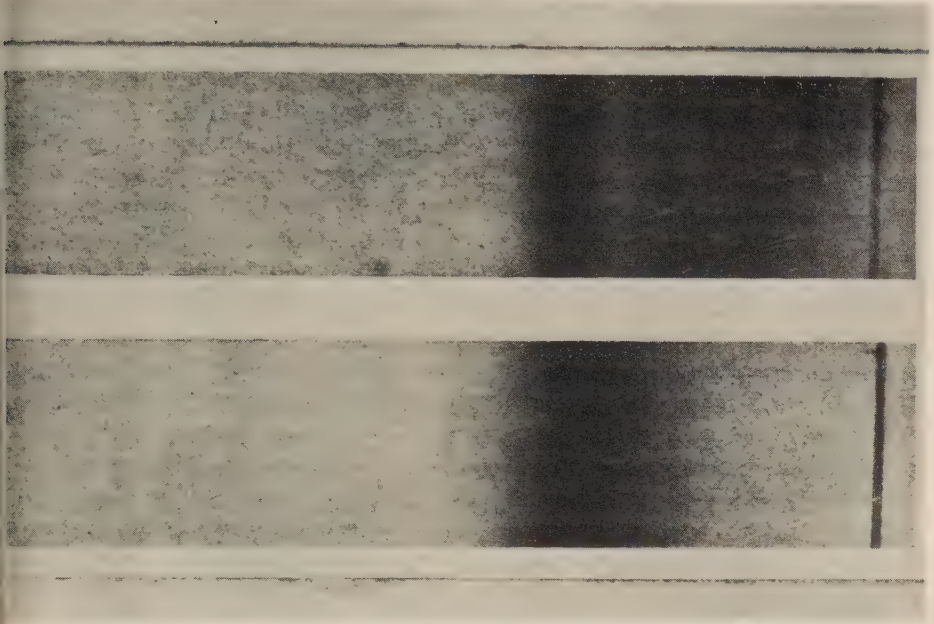
Überprüfung der Einheitlichkeit gewonnener Eiweiss-Fractionen aus Seren bei Erkrankungen mit Paraproteinaemie. Fractionen von zwei β -Plasmazytomen (a und b) und einem γ -Plasmozytom (c). Trennungen a und c in Makrozelle, Trennung b in Mikrozele.

heitliche Unterfraktion gewinnen, die dem Albumin vorausläuft und sich bei näherer chemischer Untersuchung als einheitliche Glykoproteid-Fraktion erwiesen hat. Die Wiedergaben in Abbildung 8 von Tiselius-Diagrammen solcher Fraktionen aus Normalseren zeigen, in welcher Einheitlichkeit nach diesem Verfahren die verschiedenen Globulin-Fraktionen gewonnen werden können.

Bei Fällen von M. Waldenstroem, Plasmocytom und ähnlichen Krankheitsbildern, bei denen sich in verschiedenen Globulin-Fraktionen zusätzliche pathologische homogene Fraktionen nachweisen lassen, ist für weitere Untersuchungen das Gewinnen von Paraprotein-Fraktionen besonders wertvoll. Einige Diagramme nach Tiselius (Abbildung 9) veranschaulichen den Reinheitsgrad solcher Fraktionen.

Nimmt man Eiweisslösungen aus vorher durchgeführten Fällungsfractionierungen und trennt diese, dann ist es wesentlich leichter, bei der präparativen Zonenelektrophorese einheitliche Fraktionen zu gewinnen. Das haben H. E. Schultze und H. Biel an vorgereinigten α -Rohfraktionen beobachten können. Da das Albumin im Serum den normalen Gehalt an α -Globulinen um das Sechsfache übertrifft, sahen sie darin einen Störfaktor für eine besonders weitgehende zonenelektrophoretische Auftrennung. Nach unserer Erfahrung ist das nicht nur bei der präparativen Gewinnung von α -Fraktionen der Fall. Wir haben bei einem besonderen Fällungsverfahren das Gleiche erlebt, nämlich dass aus dem Vollserum bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen die Albumine, die α_1 - und α_2 -Globuline ausgefällt werden. Die noch in Lösung gebliebenen β - und γ -Fraktionen liessen sich - nachdem sie vorher noch eingeeengt worden waren - dann besonders leicht und schnell auftrennen. Das kommt wohl daher, dass nach einer vorhergegangenen Fällung die übriggebliebenen Fraktionen sich räumlich viel besser trennen lassen. Ein Beispiel dafür bildet die analytische Trennung der β - und γ -Fraktion in Abbildung 10. Zum Vergleich wurde mit der aus dieser Fällung präparativ gewonnenen β -Globulin-Fraktion ebenfalls eine analytische Papierelektrophorese durchgeführt, aus der deren Einheitlichkeit zu ersehen ist.

ABBILDUNG 10



Präparative Gewinnung einer β -Globulin-Fraktion nach erfolgter Vorfällung (analytische Papierelektrophorese der Fraktionen).

Oberer Streifen: Überstand nach Fällung enthält eine β - und γ -Fraktion ohne Albumine und α -Globuline.

Unterer Streifen: Die daraus gewonnene β -Globulin-Fraktion ist papierelektrophoretisch einheitlich.

b) Chemische Untersuchungen an den gewonnenen Eiweissfraktionen.

Es seien nun noch einige Beispiele genannt, an denen zu sehen ist, was die chemischen Untersuchungen ^{x)} an mit Hilfe der präparativen Papierelektrophorese gewonnenen Fraktionen ergeben haben. Von besonderem Interesse war in letzter Zeit für uns die quantitative Bestimmung der proteingebundenen Kohlenhydrate. Es befinden sich in allen Fraktionen des menschlichen Serums verschiedene Mengen von gebundenen Kohlenhydraten - ausser bei der Albumin-Fraktion, für die das Nichtvorhandensein solcher Kohlenhydrate ein Zeichen für ihren weitgehenden Reinheitsgrad bedeutet (H.E. Schultze). Man wusste schon seit längerem, dass Hexosen (C. Rimington) und Hexosamine (L. Langstein) an das Eiweiss gebunden sind. Vor kurzem erst konnten L. Odin und I. Werner nachweisen, dass auch die Neuraminsäure chemisch daran gebunden sein kann. Schliesslich haben Z. Dische und M. Jacubeit die Fucose (eine Methylpentose) als proteingebundenes Kohlenhydrat in Globulinen nachweisen können. Erst in letzter Zeit fing man an, die globulingebundenen Kohlenhydrate näher zu untersuchen. Es existieren deshalb noch wenig Mitteilungen in der Fachliteratur, die alle hier genannten Kohlenhydrate behandeln. Erwähnt seien hier die Arbeiten von H.E. Schultze sowie H.E. Schultze, R. Schmidtberger und H. Haupt.

Für uns war von besonderem Interesse die Untersuchung der γ -Globuline. In Tabelle 3 sind die Werte der proteingebundenen Kohlenhydrate dargestellt, wie sie in den γ -Fraktionen von 10 Normalseren vorkommen. Diese Fraktionen waren vorher nach unserer oben beschriebenen präparativen Methode gewonnen worden. Hieraus ist die Konstanz der Kohlenhydratwerte im einzelnen (also der Hexosen, Hexosamine, Neuraminsäure und Fucose) und somit auch des Gesamtgehaltes an proteingebundenen Kohlenhydraten ersichtlich. Untersuchungen von H. Bierry liessen den Schluss zu, dass in den Globulinen als Hexosen Mannose und Galactose zu gleichen Teilen vorhanden seien. Demgegenüber aber konnten J. Sonnet sowie H.E. Schultze und Mitarbeiter nachweisen, dass es in den γ -Globulinen mehr Mannose als Galactose gibt. Diese Befunde wurden durch Untersuchungen von M. Knedel, M. Jacubeit und E. Schmid bestätigt. Sie konnten unter Anwendung des von S. Gardell beschriebenen Verfahrens der säulenchromatographischen Trennung von Hexosaminen nachweisen, dass in den γ -Globulinen von Normalserum der Hexosamin-Anteil sowohl aus Glucosamin als auch aus Galactosamin besteht. Es hat sich dabei ergeben, dass der Anteil an Glucosamin wesentlich grösser als der an Galactosamin ist (Abbildung 11). Die Frage, in welchem Verhältnis in γ -Globulinen bei Dysproteinaemien und Paraproteinaemien die einzelnen Hexosamine vorhanden sind, muss erst noch geklärt werden.

Das von uns entwickelte präparative Zonenelektrophorese-Verfahren hat es uns ermöglicht, eine bereits präparativ gewonnene γ -Fraktion unter entsprechend

^{x)} Die Werte der chemischen Bestimmungen der mit diesem Verfahren präparativ gewonnenen Fraktionen wurden von M. Knedel und P. Brünger überlassen.

TABELLE 3

Lfd. Nr.	Hexosen	Hexos- amine	Neuramin- säure	Fucose	Gesamt- Kohlenhydrate
1.	1,29	1,21	0,27	0,22	2,99
2.	1,38	1,28	0,28	0,25	3,19
3.	1,28	1,18	0,30	0,27	3,03
4.	1,34	1,44	0,24	0,22	3,24
5.	1,27	1,22	0,25	0,22	2,96
6.	1,26	1,18	0,24	0,22	2,90
7.	1,28	1,26	0,25	0,22	3,01
8.	1,23	1,22	0,28	0,24	2,97
9. ^x	1,16	1,21	0,27	0,25	2,89
10. ^x	1,22	1,18	0,26	0,25	2,91
M.	1,27	1,24	0,26	0,24	3,01
V.B.	1,16-1,38	1,18-1,44	0,24-0,30	0,22-0,27	2,89-3,24

Werte für proteingebundene Kohlenhydrate in γ -Globulinen aus Normalserum, die mit präparativer Zonenelektrophorese gewonnen wurden. Bei den mit ^x bezeichneten Fraktionen wurde die Zonenelektrophorese nach einer vorausgegangenen Fällung durchgeführt.

Die oben angeführten Zahlen geben den Gehalt an proteingebundenen Kohlenhydraten in %, bezogen auf Eiweiss, wieder.

M. = Mittelwert aus den Einzelwerten 1 - 10

V.B. = Angabe der Variationsbreite.

Chemische Bestimmungsmethoden:

Hexosen: Sørensen M. u. Haugaard G.: Biochem. Z. 260: 247/1933

Hexosamine: Elson L.A. u. Morgan W.T.J.: Biochem. J. 27: 1824/1933,
eigene Modifikation

Neuraminsäure: Böhm P., Dauber St. u. Baumeister L.: Klin. Wschr. 32:
189/1954

Fucose: Dische Z. u. Shettles L.B.: J. Biol. Chem. 175: 595/1948

Die Gesamteiweissbestimmung erfolgte mit der Biuret-Methode nach Gornall

A.G., Bardawill Ch.J. u. David M.M.: J. Biol. Chem. 177: 751/1949.

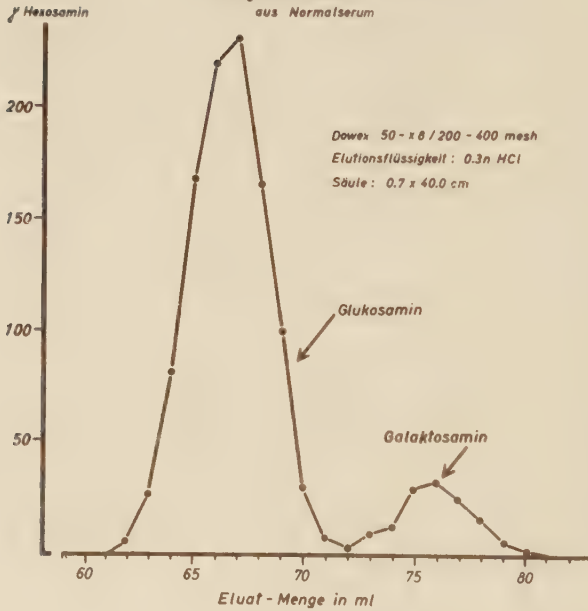
Säulenchromatographische Trennung

der proteingebundenen Hexosamine

von zonenelektrophoretisch isoliertem

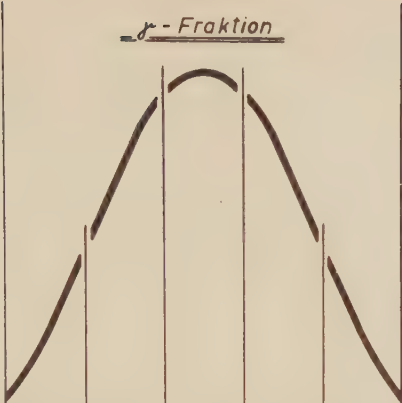
γ -Globulin

aus Normalserum



Säulenchromatographische Trennung der proteingebundenen Hexosamine von isoliertem γ -Globulin aus Normalserum.

TABELLE 4

						Werte der γ -Gesamtfraction vor Unterfraktionierung	Schwankungsbreite von 10 präp. isolierten γ -Fraktionen von Normalen
Fraktionen	a	b	c	d	e		
Hexosen	1.66	1.41	1.30	1.24	1.17	1.37	1.16 - 1.38
Hexosamine	1.62	1.39	1.24	1.18	1.12	1.28	1.18 - 1.44
Neuraminsäure	0.56	0.47	0.32	0.24	0.14	0.30	0.24 - 0.30
Fucose	0.24	0.24	0.26	0.25	0.23	0.24	0.22 - 0.27
Gesamt Kohlenhydrate	4.08	3.51	3.12	2.91	2.66	3.19	2.89 - 3.24
Hexosen / Hexosamine	1.02	1.01	1.04	1.05	1.04	1.06	
Neuraminsäure / Fucose	2.33	1.96	1.24	0.96	0.61	1.25	

Weitere Fraktionierung einer γ -Globulin-Fraktion. Eine mit Hilfe der präparativen Papierelektrophorese gewonnene γ -Globulin-Fraktion wurde mit dem gleichen Verfahren weiter fraktioniert, so dass 5 Unterfraktionen a, b, c, d, e auf Grund der verschiedenen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten erhalten wurden. Die Fraktion γ -a ist dabei am schnellsten beweglich, die Fraktion γ -e am langsamsten.

Die in der Tabelle angeführten Zahlen geben den Gehalt an proteingebundenen Kohlenhydraten in %, bezogen auf Eiweiss, wieder. Chemische Untersuchungsmethoden; siehe Angaben in Tabelle 3.

abgestimmten Voraussetzungen (siehe oben S. 22) noch weiter zu unterteilen. Die durch die chemischen Untersuchungen der so gewonnenen Unterfraktionen erhaltenen Werte sind aus Tabelle 4 zu ersehen, in der auch schematisch die Lage der Schnittlinien bei der Präparation eingezeichnet ist. Dabei bezeichnet die mit "a" genannte Unterfraktion den der Anode zugewandten Teil der γ -Globuline, die mit "e" bezeichnete den der Kathode zugewandten. Es hat sich hierbei klar herausgestellt, dass die Unterfraktion "a" höhere Kohlenhydratwerte hat gegenüber der Unterfraktion "e". Ebenso verhält es sich mit den Hexosen und Hexosaminen, wie die im einzelnen durchgeführten chemischen Untersuchungen gezeigt haben. Das Verhältnis dieser einzelnen Kohlenhydrate zueinander bleibt somit durch sämtliche Unterfraktionen konstant. Wesentlich anders dagegen verhält es sich bei Neuraminsäure. Hier zeigen die schneller beweglichen Anteile - gemessen an dem Mittelwert der normalen γ -Globuline - wesentlich höhere, die langsamen dagegen wesentlich geringere Werte. Konstant dagegen bleiben in allen Unterfraktionen die Fucose-Werte. Besonders klar lässt sich dieser Sachverhalt bei der Neuraminsäure und Fucose aus ihrem jeweiligen Verhältnis zueinander veranschaulichen. Schon M. Hanig sowie G. L. Ada und J. D. Stone haben erkannt, welchen Einfluss die Neuraminsäure als Ladungsträger auf die Beweglichkeit der Erythrozyten hat. Auf Grund seiner eigenen Untersuchungen war H. E. Schultze zu der Annahme gekommen, dass die Neuraminsäure in den γ -Globulinen den grössten Teil der negativen Ladung ausmacht. Das ist aus Tabelle 4 klar ersichtlich. Damit hat sich auch auf diese Weise bestätigen lassen, dass auch chemisch unterschiedliche Komponenten innerhalb der γ -Globuline vorhanden sein müssen.

In einer Reihe von Untersuchungen an Paraproteinen, die bei Fällen von Plasmocytom, M. Waldenstroem, paraproteinaemischen Reticulosen u. a. gewonnen wurden, wurden Ergebnisse erzielt, die aus Tabelle 5 zu ersehen sind.

TABELLE 5

Name	Geb. Jahr	Diagnose	Beweglichkeit elektrophor.	Paraprotein- fraktion		rel. Anteil im Serum	absoluter Gehalt im Serum	in %, bezogen auf Eiweiss					Gesamt-KH
				rel. %	%			Hexosen	Hexosamine	Neuramin- säure	Fucose		
Ra.	1897	Plasmocytom	α_2	32,4	2,36			2,85	2,66	1,67	0,24	7,42	
Do.	1898	Plasmocytom	β	62,4	5,53			1,59	2,29	1,39	0,28	5,55	
Wie.	1889	Plasmocytom	γ	44,2	4,73			1,68	1,75	0,69	0,22	4,34	
Kra.	1905	Plasmocytom	γ	46,0	4,44			1,03	1,05	0,29	0,25	2,62	
Kva.	1891	Plasmocytom	γ	36,3	3,26			0,37	0,68	0,09	0,26	1,40	
Ben.	1919	Reticulose	β	32,1	2,84			1,13	2,71	1,55	0,28	5,67	
Tho.	1906	Reticulose	γ	49,7	4,60			1,08	1,17	0,27	0,30	2,82	
Hü.	1899	M. Waldenstroem	γ	44,4	3,72			3,52	3,45	0,83	0,61	8,41	
Pfe.	1901	M. Waldenstroem	γ	33,6	2,98			4,14	3,02	0,85	0,64	8,65	
Fie.	1890	Plasmocytom m. Makroglobulinaemie	γ	56,3	3,81			4,90	2,69	1,41	0,59	9,59	
Mittelwerte aus 10 γ -Globulinfraktionen aus Normalseren, siehe Tabelle 3													
								1,27	1,24	0,26	0,24	3,01	

Werte für proteingebundene Kohlenhydrate in Paraproteinfraktionen, die bei verschiedenen Formen von Paraproteinaemie mit präparativer Zonelektrophorese gewonnen wurden. Das Vorliegen von Makroglobulinen bei den Fällen Hdl., Pfe. und Fie. ist durch Ultrazentrifugen-Untersuchung gesichert.

Chemische Bestimmungsmethoden: siehe Angaben zu Tabelle 3.

ZUSAMMENFASSUNG

In Anlehnung an das bereits bekannte Verfahren der analytischen Papierelektrophorese wurde ein neues Verfahren der präparativen Zonenelektrophorese ausgearbeitet. Als Trägermaterial fand dabei Filtrierpapierkarton Anwendung. In dieser Arbeit wurden die methodischen Voraussetzungen eingehend überprüft. Das im Vorliegenden beschriebene Verfahren ist zu präparativen Gewinnungen von Fraktionen aus Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten geeignet. Mit der angegebenen Apparatur und bei Verwendung des passenden Trägermaterials ist es möglich, bis zu 15 cm^3 Serum beziehungsweise bis zu 1000 mg Eiweiss in einem einzigen Arbeitsprozess zu trennen.

Bis zu welchem Grad sich die Einheitlichkeit der präparierten Fraktionen erreichen lässt, zeigen die Abbildungen der Kontrollelektrophoresen nach Tiselius. Nach der methodischen Darstellung wurden einige Ergebnisse chemischer Untersuchungen an isolierten Proteinfractionen sowohl aus normalen als auch pathologischen Seren als Beispiele angeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Althaus, G.: Diss., Marburg 1955
- Berraz G.: An. Asoc. quim. arg. 31, 96 (1943)
- Bierry H.: Compt. r. Acad. Sci. 191, 1381 (1930)
- Bockemüller W. u. Rebling R.: Chemie-Ing. -Techn. 24, 617 (1952)
- Brattsten J. u. A. Nilsson: Ark. Kemi 3, 337 (1951)
- Brattsten J.: Ark. Kemi 8, 227 (1955)
- Consden R., Gordon A.H. u. Martin A.J.P.: Biochem. J. 40, 33 (1946)
- Coolidge T.B.: J. biol. Chem. 127, 551 (1939)
- Cremer H.D. u. Tiselius A.: Biochem. Z. 320, 273 (1950)
- Dicastro G. u. San Marco M.: J. Chem. Soc. 1954:4157
- Dische Z. u. Jacubeit M.: Fed. Proc. 14:203 (1955)
- Durrum E.L.: J. Am. Chem. Soc. 72, 2943 (1950)
- Durrum E.L.: J. Am. Chem. Soc. 73, 4875 (1951)
- Fischer A. u. Behrens M.: Hoppe-Seylers Z. 291, 14 (1952)
- Flodin P. u. Porath J.: Biochim. biophysica Acta 13, 175 (1954)
- Gardell S.: Acta Chem. Scand. 7, 207 (1953)
- Grassmann W. u. Hannig K.: Votr. Dtsch. Physiol. u. physiol. Chem., Göttingen, 31.8.1949
- Grassmann W.: Angew. Chem. 62, 170 (1950)
- Grassmann W. u. Hannig K.: Naturwiss. 37, 496 (1950)
- Grassmann W., Hannig K. u. Knedel M.: Dtsch. Med. Wschr. 76, 333 (1951)
- Grassmann W. u. Hannig K.: Hoppe-Seylers Z. 292, 32 (1953)
- Grassmann W. u. Hannig K.: in Houben-Weyl "Methoden der organischen Chemie", Bd.I/1, 685 (1958), Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Hanig M.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 68, 385 (1948)
- Hartmann F. u. Müller H.J.: Naturwiss. 39, 282 (1952)

- Haugaard G. u. Kroner T.D.: J. Am. Chem. Soc. 70, 2135 (1948)
- Klobusitzky D. v. u. König P.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 192, 271 (1939)
- Knedel M.: Plasma 1, 87 (1953)
- Knedel M. u. Althaus G.: 3. Coll. St. Jans Hospital, Brügge 1955: 101
- Köiv E. u. Grönwall A.: Scand. J. Lab. Clin. Invest. 4, 244 (1952)
- König P.: Act. trab. III Congr. Sul.-Am. Chim., Rio de Janeiro e Sao Paulo 2, 334 (1937)
- Kunkel H.G. u. Slater R.J.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 80, 42 (1952)
- Langstein L.: Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 1, 259 (1901)
- Latner A.L., Raine L., Ross G.I.M. u. Ungley C.C.: Biochem. J. 52, XXXIII (1952)
- Michaelis L.: Biochem. Z. 234, 139 (1931)
- Nernst W.: Z. El. Ch. 3, 308 (1897)
- Nikkilä E.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl. 8 (1953)
- Odin L. u. Werner I.: Acta Soc. Med. Uppsal. 57, 227 (1952)
- Pauli W.: Bio. Z. 187, 403 (1927)
- Pauli W.: Helv. 25, 137 (1942)
- Peeters H., Vuylsteke P. u. Noe R.: 4. Coll. St. Jans Hospital, Brügge 1956, 63
- Porath J.: Acta chem. scand. 8, 1813 (1954)
- Porter W.L.: Analyt. Chem. 23, 412 (1951)
- Prausnitz P.H. u. Reotstötter J.: Elektrophorese, Elektroosmose, Elektrodialyse, Verlag Th. Steinkopf, Dresden, Leipzig 1931
- Rimington C.: Biochem. J. 23, 430 (1929)
- Russ E.M., Eder H.A. u. Barr D.P.: Am. J. Med. 11, 468 (1951)
- Schultze H.E.: Angew. Chem. 62, 395 (1950)
- Schultze H.E. u. H. Biel: Behring-Werk-Mitt. 30, 72 (1955)
- Schultze H.E., Göllner I., Heide K., Schönenberger M. u. Schwick G.: Z. Naturf. 10 b, 463 (1955)
- Schultze H.E.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10, Suppl. 1957

- Schultze H.E., Schmidtberger R. u. Haupt H.:
Biochem. Z. 329, 490 (1958)
- Smithies O.:
Biochem. J. 61, 629 (1955)
- Sonnet J.:
4. Coll. St.Jans Hospital, Brügge 1956, 111
- Stone J.D. u. Ada G.L.:
Brit. J. Exper. Pathol. 31, 263 (1950)
- Stone J.D. u. Ada G.L.:
Brit. J. Exper. Pathol. 31, 275 (1950)
- Strain H.H. u. Sullivan J.C.: Anal. Chem. 23, 816 (1951)
- Svensson H. u. Brattsten J.: Ark. Kemi 1, 401 (1949)
- Swahn B.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl. 9, (1953)
- Theorell H.:
Bio. Z. 275, 1 (1935)
- Tiselius A.:
Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal.(IV) 7, 4 (1930)
- Tiselius A.:
Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937)
- Tiselius A.:
Koll. Z. 85, 129 (1938)
- Turba F. u. Enenkel H.J.: Naturwiss. 37, 93 (1950)
- Weimer H.E., Mehl J.W. u. Winzler R.J.:
J. Biol. Chem. 185, 561 (1950)
- Wieland Th. u. Fischer E.: Naturwiss. 35, 29 (1948)
- Witmer R.:
Schweiz. Med. Wschr. 82, 449 (1952)

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Professor Dr. med. H. SCHWIEGK für die Überlassung des Themas aussprechen. Des weiteren sei Herrn Dr. med. M. KNEDEL herzlich für die grosszügige Bereitstellung des Labors mit seinen Einrichtungen sowie für seine wertvollen Hinweise gedankt. Fernerhin sei bestens Fräulein Dr. med. E. SCHMID und Herrn Dr. med. P. BRÜNGER für die freundliche Überlassung chemischer Untersuchungsergebnisse Dank gesagt. Schliesslich danke ich Frau A. KÖHLER, med.-techn. Assistentin, für ihre praktischen Ratschläge und ihre Hilfe.

LEBENS LAUF

Am 20. Februar 1931 wurde ich als drittes Kind des Pfarrers Gustav Sperl und seiner Ehefrau Marie, geb. Seemann, in Oberaltertheim bei Würzburg geboren. Im Jahre 1935 erhielt mein Vater eine Pfarrstelle in Schwabach. Ich besuchte dort von 1937 - 1941 die Volksschule und anschliessend das Humanistische Neue Gymnasium in Nürnberg. Im Jahre 1946 bewarb sich mein Vater aus gesundheitlichen Gründen um eine kleinere Stelle und seitdem wohnen wir in Gustenfelden bei Schwabach.

Im Sommer des Jahres 1950 legte ich in Nürnberg die Reifeprüfung ab. Anschliessend arbeitete ich ein Jahr lang bei der Firma Bergner in Schwabach als Praktikant, begann sodann mit dem Studium der Physik in Bamberg und setzte mein Studium nach zwei Semestern in München fort.

Schliesslich musste ich jedoch erkennen, dass dieses für mich einmal später nicht der richtige Beruf sein würde. So entschloss ich mich - nun doch einem bereits früheren Wunsche folgend - Medizin zu studieren. Nach Anrechnung eines vorklinischen Semesters konnte ich mich im Februar 1957 in München der Ärztlichen Vorprüfung und im Frühjahr 1960 - ebenfalls in München - dem Ärztlichen Staatsexamen unterziehen.

